

Université de Montréal

**Étude de la cytolyse autologue et du mimétisme immunitaire dans  
l'hépatite autoimmune de type 2**

par  
Simon Ethier

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie et Immunologie

Avril 2003

© Simon Ethier, 2003



W

4

U58

2003

V.117

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de la cytolyse autologue et du mimétisme immunitaire dans  
l'hépatite autoimmune de type 2**

présenté par :

Simon Ethier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Ali Ahmad  
président-rapporteur

Hugo Soudeyns  
directeur de recherche

Fernando Alvarez  
membre du jury

## Résumé

L'hépatite autoimmune de type 2 (HAI-2) se caractérise par la présence de cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  autoréactives et d'autoanticorps (LKM1) reconnaissant l'antigène hépatique cytochrome P4502D6 (CYP2D6). De tels autoanticorps ont aussi été observés chez certains patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC), suggérant l'existence d'une réaction immunitaire croisée entre un ou plusieurs antigènes du VHC et CYP2D6. Notre hypothèse soutient que certaines composantes de la réponse cellulaire antivirale contre le VHC sont effectivement dirigées contre les antigènes du soi (mimétisme moléculaire). Afin de la vérifier, les lymphocytes T de patients LKM1<sup>+</sup> et/ou VHC<sup>+</sup> ont été isolés à partir d'échantillons de foie ou de sang périphérique, puis clonés en dilution limite afin d'obtenir des populations monoclonales. Celles-ci ont été utilisées lors de tests de cytotoxicité (relâche de  $^{51}\text{Cr}$ ) dans un système entièrement autologue. Plusieurs micropopulations VHC-spécifiques ont été ainsi isolées et leur spécificité antigénique a été partiellement caractérisée. Nous avons par la suite procédé à la transfection de CYP2D6 dans des lignées de cellules B transformées par EBV et avons vérifié son expression par diverses méthodes (immunobuvardage, immunofluorescence, immunoprécipitation et analyse par cytométrie en flux). Ces méthodes ne nous ont pas permis de confirmer l'expression de CYP2D6. Nous avons donc développé une procédure de co-transfection utilisant un plasmide marqueur exprimant la « green fluorescent protein » (GFP). Ceci nous a permis de trier les cellules co-transfectées afin d'isoler en culture celles ayant incorporé la GFP et CYP2D6. Ces cellules pourront servir de cibles autologues dans des tests de cytotoxicité qui nous permettront d'identifier les lymphocytes autoréactifs et de définir les autoépitopes impliqués dans le mimétisme moléculaire. Ces recherches vont aider à cerner les caractéristiques des lymphocytes T reconnaissant CYP2D6 et de mieux comprendre la genèse et l'évolution de la réactivité autoimmune chez les patients atteints de l'HAI-2 et de l'hépatite C.

**Mots clés :** Hépatite autoimmune de type 2 (HAI-2), autoantigènes, anti-liver/kidney microsome type 1 (LKM1), virus de l'hépatite C (VHC), cytochrome P4502D6 (CYP2D6), mimétisme moléculaire, lymphocytes T autoréactifs.

## Abstract

Type 2 autoimmune hepatitis (AIH-2) is characterized by the presence of autoreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and autoantibodies (LKM1) recognizing cytochrome P4502D6 (CYP2D6). Such autoantibodies were also observed in a subset of patients infected with hepatitis C virus (HCV), suggesting the existence of immune cross reactivity between one or more HCV proteins and CYP2D6. Our hypothesis is that some components of the antiviral cellular response against HCV are also directed against self antigens (molecular mimicry). In order to validate this hypothesis, LKM1<sup>+</sup> and/or HCV<sup>+</sup> patients-derived T lymphocytes were isolated from liver samples or from peripheral blood and then cloned by limiting dilution to obtain monoclonal micropopulations. They were used as effector cells in cytotoxicity tests (release of <sup>51</sup>Cr) in an autologous system. Several HCV-specific micropopulations were isolated and their antigenic specificity was partially characterized. We proceeded thereafter to transfect CYP2D6 in autologous EBV-transformed B cell lines and tested its expression by various methods (western blots, immunofluorescence, immunoprecipitation and flow cytometry). These methods did not confirm the expression of CYP2D6. Therefore, we have developed a co-transfection procedure based on a plasmid expressing the green fluorescent protein (GFP). This method enabled us to sort co-transfected cells and to isolate in culture those that had incorporated GFP and CYP2D6. These cells can be used as targets in cytotoxicity testing which will allow us to identify autoreactive T lymphocytes and autoepitopes implicated in molecular mimicry. This research will help us determine the characteristics of T lymphocytes that recognize CYP2D6 and to better understand the genesis and evolution of the autoimmune reactivity observed in AIH-2 and/or HCV patients.

**Keywords:** Type 2 autoimmune hepatitis (AIH-2), autoantigens, anti-liver/kidney microsome type 1 (LKM1), hepatitis C virus (HCV), P4502D6 cytochrome (CYP2D6), molecular mimicry, autoreactive T lymphocytes.

## Table des matières

PAGE TITRE .....	I
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY .....	II
RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT (RÉSUMÉ EN ANGLAIS) .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
DÉDICACE .....	XIII
REMERCIEMENTS .....	XIV
 INTRODUCTION .....	 1
1. IMMUNOLOGIE GÉNÉRALE.....	1
1.1 Système immunitaire .....	1
1.2 Reconnaissance des antigènes .....	1
1.3 Développement du répertoire des lymphocytes T .....	2
1.4 Immunité orchestrée par les lymphocytes T .....	2
2. AUTOIMMUNITÉ .....	4
2.1 Définition.....	4
2.2 Autoanticorps .....	4
2.3 Autoimmunité de type « organes spécifiques » et « systémique » .....	5
2.4 Exemples de maladies autoimmunes .....	6
3. HÉPATITE C.....	8
3.1 Description.....	8
3.2 Pathogenèse.....	10
3.3 Incidence .....	10
3.4 Association avec les maladies hépatiques et autoimmunes.....	11
3.5 Traitements.....	11
4. HÉPATITE AUTOIMMUNE.....	12
4.1 Définition et historique .....	12
4.2 Histologie.....	13
4.3 Autoanticorps .....	16
4.5 Aspect clinique.....	19
4.6 Classification .....	20
5. HÉPATITE AUTOIMMUNE DE TYPE 2.....	22
5.1 Définition et historique .....	22
5.2 Incidence, statistiques et démographie .....	22
5.3 Association avec d'autres maladies autoimmunes .....	23
5.4 Facteurs de risque .....	23
5.5 Pathogenèse.....	23
5.6 Immunohistochimie .....	25
5.7 Autoanticorps LKM1 .....	25



<i>5.8 Cytochrome P450 2D6</i> .....	27
<i>5.9 Hypothèse : Mimétisme moléculaire</i> .....	32
<i>5.10 HAI-2 et VHC</i> .....	33
<i>5.11 Traitement de l'HAI-2</i> .....	37
<b>OBJECTIFS ET PLAN DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>40</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>42</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>53</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>90</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 :	Système de pointage révisé pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune.	14
Tableau 2 :	Les différents autoanticorps dans l'hépatite autoimmune de type 1 et 2.	21
Tableau 3 :	Différences entre les patients atteints de l'HAI-2 ou VHC <sup>+</sup> /LKM1 <sup>+</sup> , ainsi que leurs épitopes anti-LKM1.	34

## Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique du virus de l'hépatite C.	9
Figure 2 :	Images d'un foie normal et de foies atteints par l'HAi.	15
Figure 3 :	Distribution et fréquence des autoanticorps anti-muscle lisses (SMA) et anti-noyau (ANA) dans l'hépatite autoimmune.	17
Figure 4 :	Association de l'hépatite autoimmune avec d'autres maladies.	24
Figure 5 :	Épitopes linéaires des autoanticorps anti-LKM1 retrouvés sur le cytochrome P450 2D6.	28
Figure 6 :	Famille des cytochromes P450 et leurs implications dans diverses maladies.	31
Figure 7 :	Quelques homologies entre le VHC et le CYP2D6.	36
Figure 8 :	Résumé général du projet.	41
Figure 9 :	Caractéristiques des recombinants vaccinia utilisés et localisation graphique des différents peptides couvrant le VHC.	46
Figure 10 :	Résumé des quantités de cellules obtenues par gradient de Ficoll pour chaque patient.	54
Figure 11 :	Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1 <sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #1 et #2.	56
Figure 11 (suite) :	Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1 <sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #3 et #4.	57
Figure 12 :	Fréquence cumulative de la reconnaissance antigénique pour chaque cible lors des tests de cytotoxicité effectués sur le patient HAI001.	59
Figure 13 :	Assemblage du vecteur pSRα-puro-2D6 à partir du vecteur pGEM3-2D6.	61
Figure 14 :	Détection de CYP2D6 par immunobuvardage des 12 échantillons des transfections effectuées sur des cellules B à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et de l'ADN de CYP2D6.	63

Figure 15 :	Réactions de PCR pour déterminer les conditions en $MgCl_2$ et température optimales (effectuées sur CYP2D6 seulement).	65
Figure 16 :	Test de validité par PCR, des deux paires d'amorces (amorces P et O) servant à corriger l'ATG manquant ; effectué sur CYP2D6 seul.	66
Figure 17 :	Réactions de PCR utilisant cinq fois plus de matrice de départ (100 ng de CYP2D6), pour corriger l'ATG manquant.	68
Figure 18 :	Assemblage du vecteur pCMV-Script-2D6 à partir du vecteur Topo-2D6_corr.	69
Figure 19 :	Séquence de la partie N-terminale de CYP2D6 avant et après la correction par PCR de l'ATG manquant.	70
Figure 20 :	Détection de l'expression de CYP2D6 par immunobuvardage effectuée sur des cellules B transformées par le VEB et transfectées par le complexe lipovec (Invivogen) et pCMV-Script-2D6.	72
Figure 21 :	Détection de l'expression de CYP2D6 par immunofluorescence effectuée sur des cellules B transformées par le VEB et transfectées par le complexe lipovec (Invivogen) et pCMV-Script-2D6.	73
Figure 22 :	Traduction <i>in vitro</i> du plasmide TOPO-2D6.	75
Figure 23 :	Test de l'anticorps de lapin anti-CYP2D6 (Sp1) contre la protéine marquée, obtenue par traduction <i>in vitro</i> , par immunoprécipitation.	76
Figure 24 :	Immunoprécipitation de CYP2D6 transfecté par le complexe lipovec dans des cellules B transformées par le VEB, dont les protéines sont marquées au $^{35}S$ .	78
Figure 25 :	Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1 <sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #5.	79
Figure 26 :	Analyse en cytométrie en flux des cellules B du patient HAI001 transfectées avec CYP2D6 au moyen du complexe lipovec/CYP2D6.	81
Figure 27 :	Tri des cellules B du patient HAI001 transfectées avec CYP2D6 au moyen du complexe lipovec/CYP2D6.	83

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Alanine aminotransférase
ANA	Anticorps anti-noyau
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AST	Aspartate aminotransférase
CBP	Cirrhose biliaire primaire
CCDA	Cytotoxicité cellulaire dirigée par les anticorps
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSP	Cholangite sclérosante primitive
CYP	Cytochrome
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Sérum fœtal de veau
g	Gramme
h	heure
HAI	Hépatite autoimmune
HAI-2	Hépatite autoimmune de type 2
HCC	Hépatite C chronique
HLA	Antigène leucocytaire humain
IFI	Immunofluorescence indirecte
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-2	Interleukine 2
IL-4	Interleukine 4
IL-10	Interleukine 10
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
LC1	Antigène cytosolique de foie de type 1
LKM1	Antigène microsomal de foie et de rein de type 1
LES	Lupus érythémateux systémique
mg	Milligramme
min	Minute

ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MOI	Multiplicity of infection
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PHA	Phytohemagglutinine (Lectin)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLA	Antigène soluble du foie
SPA1	Syndrome polyglandulaire autoimmun type 1
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
VHC	Virus de l'hépatite C

*Pour ma famille, mes parents  
et mes proches ...*

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Hugo Soudeyns, sans qui je n'aurais jamais pu faire cette maîtrise. Il a su me guider tout au long de ce projet et répondre à mes questions quelles qu'elles soient. Nous nous sommes aperçus en route que ce projet était beaucoup plus difficile que nous le pensions, mais nous n'avons pas abandonné, et ce, malgré les débuts du laboratoire. Merci beaucoup.

Un remerciement spécial va au Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine dans lequel j'ai fait ma maîtrise. Ils m'ont, par le biais de bourses, supporté financièrement afin que je puisse poursuivre mes études. Mes remerciements vont aussi à l'Université de Montréal dans laquelle j'ai effectué mes cours et pour les bourses qu'ils m'ont permis d'obtenir.

Je voudrais aussi souligner l'aide très appréciée amenée par mes collègues de laboratoire, plus particulièrement Myriam Troesch, Sandra Akouamba, Sophie Canobio et Émilie Jalbert. Cela n'a pas toujours été facile, mais nous avons su former une bonne équipe et ce, malgré le fait que le laboratoire en était à ces débuts. Un grand merci au personnel du laboratoire du Dr Alvarez qui a su m'accueillir et me supporter tout au long de mes travaux. Lâchez pas la gang.

Tout ceci ne serait jamais arrivé si je n'avais pas eu le soutien tant moral que financier de mes parents et ma grand-mère, à qui je dois énormément. Ils m'ont supporté depuis le tout début de mes études et j'espère qu'ils seront fiers de ce que j'ai accompli et de ce que j'accomplirai dans le futur. Je leur dédie ce mémoire du plus profond de mon cœur. Merci Robert, Odette et Jacqueline.



## **INTRODUCTION**

Afin de bien comprendre cette étude qui porte sur l'activité cytolytique, basée sur le mimétisme moléculaire, de cellules autoimmunes, une revue de la littérature sera d'abord effectuée. Celle-ci comprendra notamment les sujets touchant l'immunologie générale, l'autoimmunité et l'hépatite autoimmune de type 2.

### **1. Immunologie générale**

#### ***1.1 Système immunitaire***

Il existe deux types de réponses immunitaires : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée consiste en la résistance de l'hôte à son premier contact avec un pathogène (ex. un virus). Elle est régulée par une grande variété de cellules (NK, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques) et de médiateurs solubles telles les cytokines. L'immunité acquise est quant à elle spécifique à un pathogène ou ses antigènes et est induite dans l'hôte après l'exposition. Elle consiste en des anticorps et en la génération de cellules B et T spécifiques à un pathogène. Les cellules T spécifiques au virus composent les cellules  $CD4^+$  et  $CD8^+$ , effectrices et mémoires. Les cellules T  $CD4^+$  aident à la fois la génération de cellules T  $CD8^+$  spécifiques à un virus et les cellules B. Les cellules T  $CD8^+$  tuent les cellules qui expriment à leur surface des peptides d'antigènes. Les cellules B produisent des anticorps spécifiques à l'antigène. L'infection de l'organisme mène aussi à la génération de cellules T et B mémoires. Celles-ci répondent très rapidement à l'antigène et forment la base d'une seconde réponse immunitaire plus rapide et vigoureuse lors d'une seconde exposition à ce pathogène.

#### ***1.2 Reconnaissance des antigènes***

Les récepteurs de cellules T sont structurellement similaires aux immunoglobulines. Leur diversité est possible grâce au réarrangement des

gènes V, D, C et J du récepteur. Les peptides dégradés des antigènes sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ; ce complexe antigène/CMH est reconnu par les récepteurs des cellules T  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ .

### ***1.3 Développement du répertoire des lymphocytes T***

Les cellules T se développent à partir des cellules souches de la moelle osseuse et migrent vers le thymus où ils pourront se développer pour devenir matures. Ce développement requiert une double sélection : la sélection positive garde les lymphocytes T qui sont aptes à répondre à une infection éventuelle alors que la sélection négative élimine tous les lymphocytes qui réagissent aux constituants du soi, assurant donc la tolérance.

### ***1.4 Immunité orchestrée par les lymphocytes T***

La réponse immunitaire débute lorsqu'un lymphocyte naïf rencontre un antigène. L'activation des lymphocytes T s'effectue via les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques) et est essentielle avant de réagir contre un antigène. Cette activation requiert la présence de cellules  $CD4^+$  auxiliaires, de molécules co-stimulatrices telles que B7.1 et B7.2 et de certains facteurs de croissance tel que l'interleukine (IL)-2. L'activation mène à une prolifération et une division en progéniture identique à la cellule mère, armée contre l'antigène présenté.

Les cellules  $CD8^+$  cytotoxiques utilisent un système de granzymes (mélange d'enzymes et protéases) et de perforines (provoquent la formation de pores dans la membrane cellulaire de la cellule cible), toutes deux cytotoxines, situées dans leurs vésicules afin de détruire la cellule cible. Elles peuvent activer la mort programmée de la cellule cible et constituent la majeure partie de l'activité cytotoxique. Les cellules  $CD4^+$  T auxiliaires Th1, tout comme les  $CD8^+$ , peuvent déclencher l'apoptose (par l'intermédiaire des molécules membranaires Fas/Fas-ligand) de la cellule cible.

Les cellules  $CD4^+$  Th1 sécrètent des molécules effectrices (CD40 ligand, interféron  $\gamma$ ) et soutiennent les réponses hypersensibles de type délayé. Elles sont importantes afin d'éliminer l'infection virale ainsi que d'autres pathogènes intracellulaires. Celles-ci agissent sur les macrophages afin d'induire la fusion des lysosomes avec les vésicules contenant les bactéries. Ceci augmentera donc la capacité à détruire les microorganismes phagocytés. Les molécules effectrices ont aussi le rôle d'attirer les macrophages au site d'infection.

Les cellules T sont très importantes dans l'activation des cellules B afin de détruire les pathogènes extracellulaires. Les cellules T auxiliaires Th2 sont beaucoup plus efficaces, et même essentielles, au niveau de l'activation des cellules B que les Th1, surtout lors de la réponse primaire. Très peu d'antigènes peuvent activer les cellules B par eux-mêmes ; ils requièrent l'aide de signaux provenant des cellules Th2 avant de pouvoir stimuler les cellules B afin de proliférer et se différencier en cellules capables de produire des anticorps. Elles produisent principalement de l'IL-4, IL-5 et IL-13. Les cellules Th2 peuvent aussi mener à la génération de cellules T cytotoxiques.

## **2. Autoimmunité**

### **2.1 Définition**

Les maladies autoimmunes sont définies sur le principe du bris de la tolérance du soi au niveau du système immunitaire. Dans ces maladies (qui prennent plusieurs formes) l'équilibre de la tolérance au soi est brisé, menant dans plusieurs cas à une production d'autoanticorps par les cellules B, immunoglobulines capables de reconnaître des protéines et constituants du soi et une production de lymphocytes T autoréactifs. Les causes de ce bris peuvent être multiples : l'intervention de facteurs génétiques, hormonaux et externes (environnement, virus, drogues). Il est normal de retrouver chez tous les individus des autoanticorps et des lymphocytes autoréactifs qui ne causeront aucun bris<sup>1</sup>. Seul chez certaines personnes, à l'aide d'événements déclencheurs, ils s'activeront pour briser la tolérance du soi, causant des dommages à l'organisme.

Les maladies autoimmunes touchent environ 5% de la population mondiale et représentent, aux Etats-Unis, plus de 83 milliards de dollars en frais médicaux annuels<sup>2</sup>.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires autoréactives jouent un rôle crucial dans les maladies autoimmunes. Elles sont responsables de la traduction de facteurs présents lors de celles-ci. A travers des mécanismes qui stimulent la réponse immunitaire cellulaire et humorale, ces cellules affecteront la progression de la maladie<sup>3</sup>. Les méthodes qui diminueront l'activité ou la quantité des cellules T CD4<sup>+</sup> autoréactives limiteront les réponses Th1 et/ou Th2 et ainsi donc, diminueront les symptômes de la maladie<sup>4</sup>.

### **2.2 Autoanticorps**

Dès la naissance, ils existent des autoanticorps naturels polyspécifiques dans l'organisme, de type IgM avec une faible affinité<sup>5</sup>. Ceux-ci sont sans danger

et pourraient être protecteurs. Les autoanticorps pathogènes, quant à eux, constituent un facteur de dommages et de lésions majeurs par plusieurs mécanismes tels que la destruction de la cellule (via apoptose, destruction par les cellules NK (CCDA), phagocytose), le blocage fonctionnel (d'une enzyme, d'une molécule) et la stimulation fonctionnelle d'un récepteur. À âge égal, les femmes produisent plus fréquemment des autoanticorps que les hommes, en partie dû aux facteurs hormonaux (rôle favorisant des œstrogènes et rôle protecteur des androgènes)<sup>6,7</sup>.

L'environnement peut stimuler une production d'autoanticorps : certaines maladies autoimmunes, telles les sclérodermies masculines surviennent presque constamment après une exposition aux poussières de silice<sup>8,9</sup>. Les médicaments peuvent également participer à la maladie en augmentant la production d'autoanticorps : l'interféron alpha utilisé dans le traitement de l'hépatite C peut mener à une production d'autoanticorps, tels que des autoanticorps anti-thyroïde<sup>10,11</sup>. Il existe plusieurs types de maladies autoimmunes où un virus semble être relié à celles-ci : les anticorps anti-lymphocytes ont été découvert lors d'une mononucléose infectieuse et des autoanticorps anti-microsomes de foie ont été découverts lors de l'hépatite C.<sup>12</sup>

Afin de définir la spécificité pathogénique, les anticorps autoréactifs peuvent servir de « sondes » afin de trouver les épitopes qui sont ciblés dans la maladie. Il est aussi possible d'étudier les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T autoréactives.

### **2.3 Autoimmunité de type « organes spécifiques » et « systémique »**

On peut classer les maladies autoimmunes en deux groupes :

- organes spécifiques : si la réponse autoimmune est dirigée contre des autoantigènes restreints à un seul organe (foie, rein, poumon, etc.) ou

- organes non spécifiques (ou systémiques) : si la réponse est répandue dans tout l'organisme accompagnée d'autoanticorps. Les conséquences de la maladie sont dues aux complexes d'antigènes-anticorps répandus systématiquement, c'est-à-dire dans tout l'organisme.

Chez les humains et les mammifères, il est très commun de retrouver plusieurs maladies de type organes spécifiques simultanément, tel que le diabète insulino-dépendant et la thyroïdite de Hashimoto. Il en est de même pour les maladies systémiques : le lupus érythémateux systémique (LES) et l'arthrite rhumatoïde partagent beaucoup de symptômes cliniques et coexistent souvent en même temps<sup>13</sup>.

#### **2.4 Exemples de maladies autoimmunes**

Au niveau des maladies de type organes spécifiques, le diabète insulino-dépendant est causé par une inflammation et une destruction progressive, partielle ou complète, des îlots de Langerhans du pancréas. La grande perte des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans est due à une réaction autoimmune<sup>14,15</sup> caractérisée par une infiltration de cellules mononucléaires dans certains de ces îlots. La thyroïdite de Hashimoto est caractérisée par une infiltration lymphoplasmocytaire du parenchyme thyroïdien. La maladie de Hashimoto est une forme chronique de la thyroïdite. Il y a présence d'autoanticorps anti-thyroïdiens, anti-microsomes et anti-thyroglobuline à des concentrations élevées<sup>16</sup>.

Au niveau des maladies de types systémiques, le lupus érythémateux systémique produit des autoanticorps divers dirigés contre une multitude d'antigènes, qui déclenchent la maladie<sup>17</sup>. L'étiologie de la maladie est inconnue, mais les facteurs environnementaux et génétiques semblent y contribuer. L'arthrite rhumatoïde est une inflammation systémique, encore une fois de cause inconnue, qui touche environ 1% de la population adulte sans distinction du groupe ethnique<sup>18</sup>. Le symptôme majeur est l'inflammation

des articulations, qui, si non traitée, mène à des déformations typiques<sup>18,19</sup>. Comme dernier exemple, les cryoglobulinémies sont des maladies qui peuvent être autoimmunes. Il existe 3 types, dont les cryoglobulinémies mixtes de type 2 comprenant des facteurs rhumatoïdes IgG et anti-IgG<sup>20</sup>.

### 3. Hépatite C

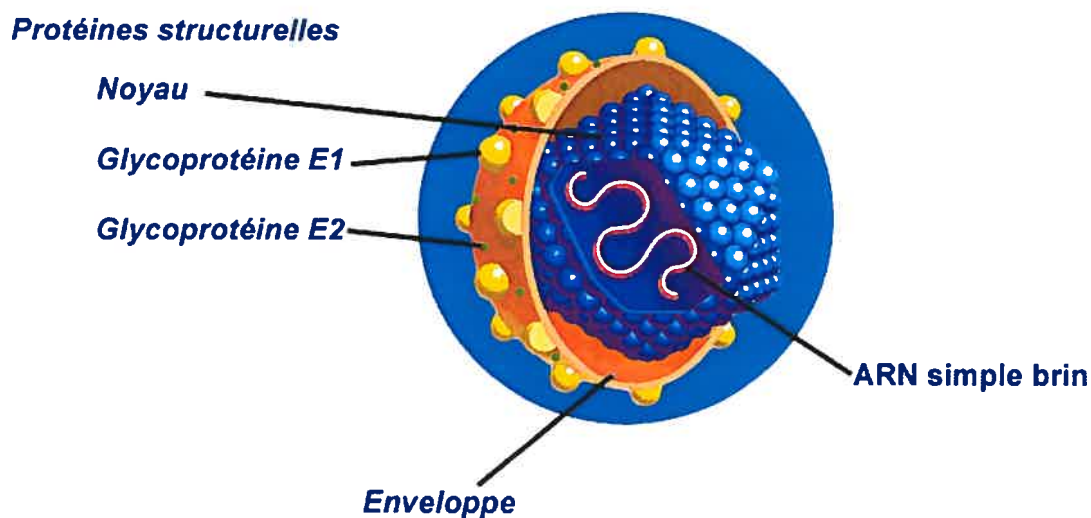
#### 3.1 Description

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989 par l'équipe de Choo *et al.*<sup>21</sup> ; la maladie était alors connue sous le nom d'hépatite non-A, non-B. Découverte dans le contexte de transfusions sanguines, elle est aussi transmissible par les utilisateurs de drogues intraveineuses<sup>22</sup>. Il est encore obscur si la maladie se transmet par les relations sexuelles, mais les individus ayant plusieurs partenaires sont plus à risque d'être infectés. Le manque d'un système de culture cellulaire adéquat pour l'étude du VHC nuit beaucoup aux recherches. Les chercheurs doivent s'en remettre aux animaux, plus particulièrement les chimpanzés et les tamarins<sup>23</sup>.

Ce virus fait parti de la famille des Flaviviridae, il est composé d'un ARN simple brin et est doté d'un génome d'environ 10 000 nucléotides. Il ne comporte qu'un seul cadre de lecture qui code pour toutes les protéines structurelles et non-structurelles<sup>24</sup>. Les protéines structurelles, au nombre de deux, regroupent la protéine du noyau nucléocapsidique (« core ») et deux protéines de l'enveloppe (E1 et E2). Ces protéines comportent une région hypervariable, pouvant muter rapidement sous la pression immunitaire, afin d'échapper à la neutralisation et faciliter la persistance virale (Figure 1).

Les protéines non-structurelles, essentielles lors de la réplication du virus, regroupent une protéase, une hélicase et une polymérase à ARN virale, ARN-dépendante. L'hélicase est produite par la région NS3 et est essentielle au niveau de la réplication virale. La protéase, provenant aussi de la région NS3 (aidée par le cofacteur NS4a), est une sérine protéase qui clive à plusieurs endroits soit entre NS4a-NS4b, NS4b-NS5a et NS5a-NS5b. NS5a est une phosphoprotéine dont la fonction est encore inconnue. NS5b, quant à lui code pour la polymérase à ARN<sup>25-27</sup>.





**Figure 1 : Représentation schématique du virus de l'hépatite C.**

Protéines structurelles		Protéines non-structurelles	
Protéine du noyau	Forme le noyau.	Protéase	Sérine protéase, clive à plusieurs endroits de la polyprotéine pour former des protéines fonctionnelles.
Glycoprotéine E1 Glycoprotéine E2	Forme l'enveloppe. L'hypervariabilité joue un rôle dans l'évasion immunitaire.	Hélicase	Produite par la région NS3, essentielle pour la réplication virale.
		Polymérase à ARN	Codé par la région NS5b.

Figure tirée et modifiée du site internet <http://www.trugene.com>.

La grande variabilité du virus mène à plusieurs génotypes (1a, 1b, 2, 3, 4, 5 et 6) et sous génotypes. La plupart des individus infectés ne le sont que par un seul génotype<sup>28</sup>.

### **3.2 Pathogenèse**

L'hépatite C provoque principalement une inflammation ainsi que des dommages au foie de l'individu atteint. La plupart des patients n'ont souvent aucun symptôme apparent, rendant le diagnostic plus difficile ; la détection de la maladie est souvent faite lors d'un examen de routine ou un don de sang. Parmi les symptômes possibles, citons la fatigue et l'ictère.<sup>29,30</sup>

L'hépatite devient chronique dans 85% des cas. Les taux d'aminotransférases peuvent varier énormément et ne sont pas significatifs de la progression de la maladie<sup>31</sup>. Presque tous les patients atteints vont développer les symptômes histologiques de l'hépatite C chronique, soit une inflammation portale et lobulaire du foie.

Environ 20% des cas vont progresser vers une cirrhose dans les dix premières années<sup>32</sup>. Il s'en suivra un dysfonctionnement du foie pouvant aboutir à un carcinome. L'hépatite C est une des maladies du foie les plus fréquentes, et la première cause de transplantations hépatiques réalisées chez les adultes. Le taux de mortalité dû à l'infection VHC augmente sans arrêt depuis plusieurs années<sup>33</sup>.

### **3.3 Incidence**

La population mondiale infectée chroniquement par le VHC s'élevait en 2001 à 170 millions d'individus<sup>34</sup>. L'infection est beaucoup plus présente en Europe de l'est et en Afrique, l'Égypte ayant le plus haut taux d'infections, celui-ci approchant les 15%<sup>25</sup>.

### **3.4 Association avec les maladies hépatiques et autoimmunes**

Déjà en 1994, la relation du VHC avec plusieurs maladies immunitaires était évoquée, comme le syndrome de Sjögren, la cryoglobulinémie, la glomérulonéphrite et la porphyrie cutanée tardive<sup>35</sup>. Les cryoglobulinémies mixtes peuvent se localiser dans tous les types de vaisseaux sanguins et sont capables d'activer tous les médiateurs de l'inflammation. Elles sont fréquemment associées à des états infectieux ou inflammatoires comme le virus de l'hépatite C (VHC) ; les facteurs rhumatoïdes monoclonaux vont alors fixer les IgG anti-VHC menant à une pathologie immunitaire<sup>36</sup>.

### **3.5 Traitements**

Le traitement général dans les cas d'hépatite C est une combinaison d'interféron  $\alpha$  et de ribavirine. Plus le degré de sévérité de la maladie sera grand, moins bon sera le taux de réponse. En général, ce traitement amène une diminution des taux d'aminotransférases et d'ARN viral dans le sang<sup>37,38</sup>. Dans bien des cas, si le traitement est arrêté, les taux d'aminotransférases augmenteront à nouveau. Environ 35% des patients auront des taux normaux après un traitement de 6 mois<sup>39,40</sup>. Celui-ci n'est responsable que de peu d'effets secondaires pour une grande partie des patients, tel la fatigue. Pour les autres, ces effets peuvent être plus sérieux telle la dépression.

## 4. Hépatite Autoimmune

### 4.1 Définition et historique

L'hépatite autoimmune (HAI) est un désordre chronique inflammatoire (nécroinflammation) progressif du foie. Elle est caractérisée par la présence d'autoanticorps, d'une hypergammaglobulinémie, d'une prédominance chez la femme et d'évidences histologiques (infiltrations de cellules mononucléaires). Si aucun traitement n'est apporté, elle est accompagnée d'un haut taux de mortalité (80% sur 5 ans, 90% sur 10 ans)<sup>41-44</sup>. Il ne s'agit pas d'une maladie virale et elle n'est pas associée à des facteurs de risques reliés à des infections virales (ex. transfusion sanguine, piqûre d'aiguille, tatouage). Un diagnostic précis et rapide est donc très important afin de prolonger la survie du patient et d'éviter une greffe du foie. Le premier diagnostic a été fait dans les années 1950 par le groupe de Waldenström lorsqu'il a observé une forme chronique de l'hépatite sur une jeune femme<sup>45</sup>. La maladie était considérée comme une forme très sévère de l'hépatite active chronique affectant les adolescentes. Depuis, plusieurs termes ont été utilisés pour nommer la maladie : hépatite chronique active (1955)<sup>46,47</sup>, hépatite lupoïde (1959)<sup>48,49</sup>, hépatite cellulaire plasmatique et hépatite chronique active autoimmune (1965)<sup>50</sup>. Depuis 1993, cette maladie est nommée hépatite autoimmune. L'HAI est classée comme maladie organe-spécifique, bien que les autoanticorps présents ne le soient toujours pas. L'HAI peut aussi être associée à d'autres maladies autoimmunes, telles que le diabète, l'hyperthyroïdisme et le syndrome de Sjögren.<sup>51</sup>

Utilisant plusieurs critères biologiques et cliniques, le Groupe international de l'hépatite autoimmune, comprenant une vingtaine de chercheurs et cliniciens, s'est rassemblé à deux reprises, en 1993 et 1999, pour mettre au point un système objectif de pointage permettant un meilleur diagnostic de la maladie<sup>52,53</sup>. Un diagnostic positif pour l'HAI requiert entre autres : une absence de virus et de marqueurs d'autres maladies du foie, un haut taux de

γ-globulines, une réponse positive aux traitements immunosuppresseurs et la présence d'autoanticorps. Le diagnostic est confirmé par un système de pointage qui comporte des points pour chaque symptôme ou signe individuel.<sup>51,53</sup> (Tableau 1)

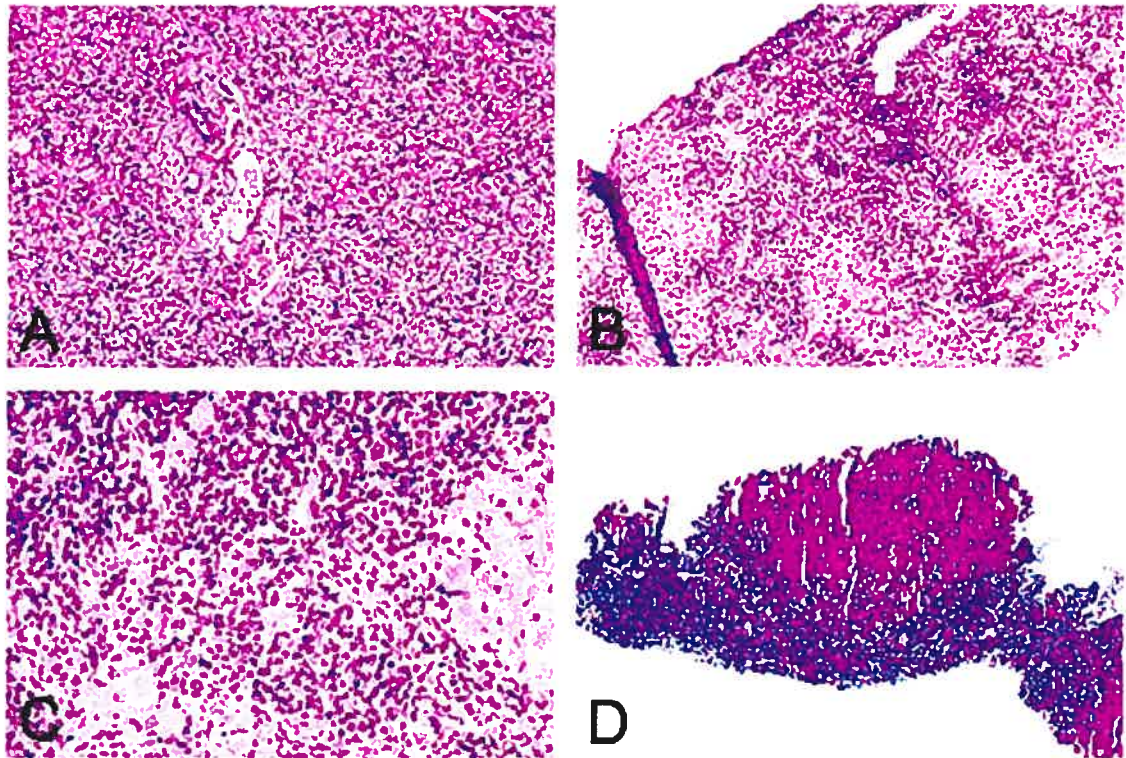
#### **4.2 Histologie**

L'HAI est caractérisée par une infiltration portale (Figure 2B) de cellules mononucléaires qui envahit la barrière des hépatocytes qui entoure la région de la triade portale. L'infiltrat inflammatoire est surtout lympho-plasmocytaire (Figure 2C), comprenant surtout des cellules T CD4<sup>+</sup>, suggérant un rôle important dans le processus pathogénique menant à l'inflammation et aux dommages cellulaires<sup>51</sup>.

Dans toutes les formes d'HAI, il y a présence de fibrose, une cicatrisation du tissu hépatique rendant inopérante les parties touchées. La fibrose dans les formes plus avancées d'HAI, spécialement si aucun traitement n'est donné, connecte les régions portales et centrales (pontage) et mène à la cirrhose (Figure 2D). Il n'y a pas une bonne corrélation entre les symptômes cliniques et les résultats de l'histologie : un patient avec symptômes sévères peut avoir une inflammation très agressive du foie avec ou sans cirrhose, alors qu'un patient asymptomatique peut avoir déjà une cirrhose<sup>54</sup>. La maladie est souvent au stade de la cirrhose lorsque des biopsies sont effectuées sur le foie des patients atteints. Ces caractéristiques histologiques ne sont pas spécifiques à l'hépatite autoimmune, mais sont aussi communes à d'autres maladies telles que l'hépatite virale chronique.<sup>55</sup>

Paramètres/Caractéristiques	Pointage
<b>Sexe féminin</b>	+2
Ratio ALP :AST (ou ALT)	
< 1.5	+2
1.5-3.0	0
> 3.0	-2
<b>Globulines du sérum ou IgG au dessus des noramles</b>	
> 2.0	+3
1.5-2.0	+2
1.0-1.5	+1
< 1.0	0
<b>ANA, SMA ou LKM-1</b>	
> 1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
< 1:40	0
<b>AMA positif</b>	-4
<b>Marqueurs viraux de l'hépatite</b>	
Positif	-3
Négatif	+3
<b>Historique des drogues</b>	
Positif	-4
Négatif	+1
<b>Moyenne de prise d'alcool</b>	
< 25 g/jour	+2
> 60 g/jour	-2
<b>Histologie du foie</b>	
Interface hépatique	+3
Infiltrat lymphoplasmatique prédominant	+1
« rosetting » des cellules du foie	+1
Aucun de ceux ci haut	-5
Changements biliaires	-3
Autres changements	-3
<b>Autres maladies autoimmunitaires</b>	+2
<b>Paramètres optionnels additionnels</b>	
Séropositivité pour d'autres autoanticorps définis	+2
HLA DR3 ou DR4	+1
Réponse aux thérapies :	
Complète	+2
Rechute	+3
<b>Interprétation des pointages :</b>	
Pré-traitement :	
HAI définitive	> 15
HAI probable	10-15
Post-traitement	
HAI définitive	> 17
HAI probable	12-17

**Tableau 1 : Système de pointage révisé pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune.** Le système a été établi par le Groupe international de l'hépatite autoimmune et a été révisé plusieurs fois entre les années 1990 et 2000. *Données tirées et modifiées de la référence 50.*



**Figure 2 : Images d'un foie normal et de foies atteints par l'HAI.** A, section d'une région périportale d'un foie normal (hématoxyline et éosine, x 100). B, infiltration portale et périportale (hématoxyline et éosine, x 100). C, infiltration dense de cellules plasmatiques (hématoxyline et éosine, x 250). D, cirrhose du foie (Trichrome de Masson, x 40). *Figures tirées et modifiées de la référence 52.*

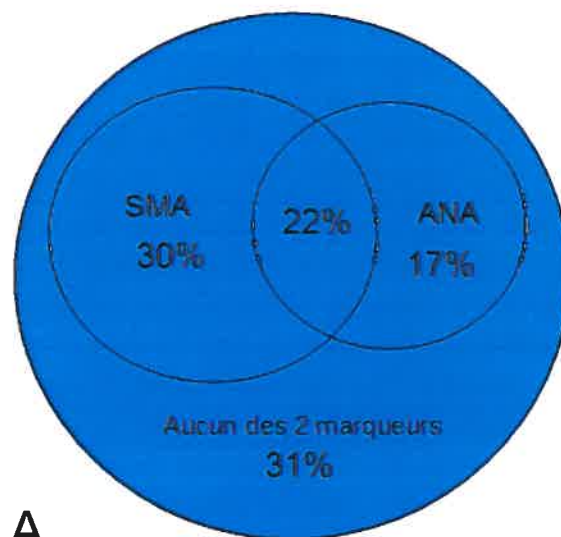
### 4.3 Autoanticorps

Les autoanticorps présents dans le sérum des patients atteints de l'HAI sont :

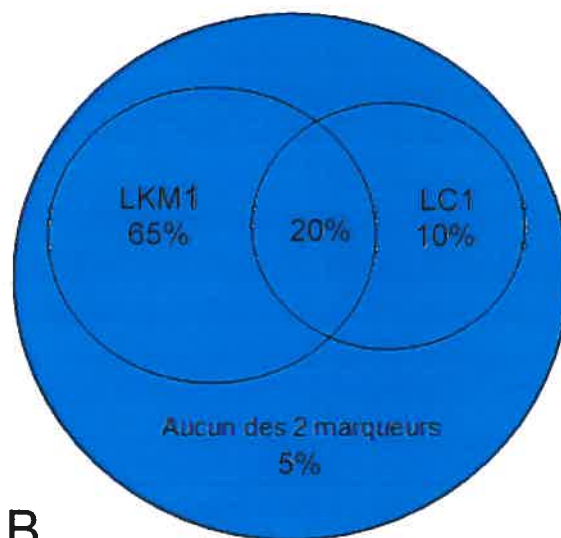
- Anti-noyau (ANA) : ils sont retrouvés à une fréquence d'environ 40% chez les patients atteints de l'HAI (dont 15% où ANA est le seul autoanticorps présent). Leurs cibles sont hétérogènes et multiples.
- Anti-muscles lisses (SMA) : ils sont retrouvés à une fréquence de 52% chez les patients atteints de l'HAI (dont 25-35% où SMA est le seul autoanticorps présent). Dans les HAI ces autoanticorps sont dirigés principalement contre les filaments d'actine.
- Anti-microsomes de foie et de rein de type 1 (« liver-kidney microsome type 1 » LKM1) : ils sont dirigés contre la protéine CYP2D6 et sont présents dans 85% des cas d'HAI-2, dont 20% en commun avec les autoanticorps LC1.
- Anti-cytosol de foie de type 1 (« anti-liver cytosol » LC1)<sup>41</sup> : ils sont dirigés contre la formiminotransférase-cyclodésaminase (FTCD)<sup>56</sup> et sont présent dans 30% des cas d'HAI-2.

De plus, 22% des patients ont à la fois des autoanticorps ANA et SMA, et 20% des autoanticorps LKM1 et LC1. Environ 30% n'ont aucun des deux autoanticorps ANA et SMA, alors que 5% seulement n'ont ni les autoanticorps LKM1 ni les LC1. Les titres des autoanticorps ANA et SMA sont de  $> 1:80$  chez les adultes atteints de l'HAI et  $> 1:40$  chez les enfants atteints<sup>57</sup> (Figure 3). Les autoanticorps ANA et SMA caractérisent l'HAI de type 1 et les anti-LKM1 et anti-LC1 les HAI de type 2.





A



B

**Figure 3 : A) Distribution et fréquence des autoanticorps anti-muscle lisses (SMA) et anti-noyau (ANA) dans l'hépatite autoimmune de type 1. B) Distribution et fréquence des autoanticorps anti-microsomes de foie et de rein de type 1 (LKM1) et anti-cytosol de foie de type 1 (LC1) dans l'hépatite autoimmune de type 2.**

*Figure adaptée de la référence 40.*

#### **4.4 Pathogenèse**

L'hypothèse de la cause de l'HAJ est qu'un hôte prédisposé génétiquement est exposé à un agent environnemental qui déclenche un processus autoimmunitaire dirigé contre les antigènes du foie. Ce processus cause une nécroinflammation et une fibrose du foie, pour éventuellement aboutir à une cirrhose. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aussi appelé « human leukocyte antigen » (HLA)<sup>58</sup> sur le chromosome 6 est un facteur de prédisposition génétique. Il y a une association entre l'HAJ et les locus HLA classe I A1, B8 et classe II DR3, DR4 et DR52a<sup>59-61</sup>. La présence du HLA DR4 est trouvée chez des patients avec un âge plus élevé et une maladie plus bénigne<sup>55</sup>. Les autoanticorps sont fréquemment retrouvés dans le sang des proches parents du patient atteint de l'HAJ<sup>62</sup>.

Il existe deux exemples de mécanismes qui contribuent aux dommages causés au foie dans l'HAJ :

- Une cytotoxicité cellulaire engendrée par les cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires activées et les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Ces lymphocytes sont activés par les autoantigènes présentés par les molécules du CMH de classe 1 et vont, par la suite, s'attaquer aux hépatocytes du foie à l'aide de la perforine et des granzymes. Cette attaque nécessite une infiltration dans le foie des lymphocytes qui sont activés contre les autoantigènes.<sup>63,64</sup>
- Une cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante contribue aussi aux dommages. La production d'IgG par les cellules plasmiques résulte en la formation de complexes antigène-anticorps sur la surface des membranes des hépatocytes du foie<sup>65,66</sup>. Les récepteurs Fc des cellules NK vont ensuite cibler les complexes formés menant à la lyse des hépatocytes. Cette cytotoxicité est supportée par une expérience

d'agrégation de complexes antigène-anticorps à la surface d'hépatocytes<sup>67</sup> et de surexpression d'IL-10 chez certains patients<sup>68</sup>.

#### **4.5 Aspect clinique**

Les symptômes de l'HAi, une maladie hépatique chronique, varient grandement<sup>55</sup>. Quelques fois, l'HAi est caractérisée par un ictère profond, des niveaux élevés d'aminotransférase dans le sérum et de la fatigue. Une caractéristique de l'HAi, qui n'est cependant pas universelle, néanmoins souvent présente, est une élévation (2 fois) prononcée du taux de  $\gamma$ -globulines dans le sang (hypergammaglobulinémie). Notons aussi une augmentation pouvant aller de 5 à 10 fois des niveaux d'aspartate aminotransférase (AST) et d'alanine aminotransférase (ALT)<sup>44</sup>. Si elle n'est pas traitée, la maladie évoluera vers une cirrhose du foie, menant, tout comme l'hépatite C, à un dysfonctionnement et requerra une transplantation.

#### **4.6 Population touchée**

Il est reconnu que l'HAi touche beaucoup plus fréquemment les femmes que les hommes, avec un rapport de 3.6-4/1<sup>43,44,64,69</sup>. Elle survient à deux intervalles d'âges : entre 10 à 20 ans et 45 à 70 ans.

La prévalence de l'HAi est de 0.1 à 1.9 et 1.2 cas sur 100 000 en Europe et en Amérique du Nord respectivement, mais seulement de 0.015 à 0.08 cas sur 100 000 au Japon<sup>70</sup>. En Amérique du Nord, l'HAi compte pour 20% des cas d'hépatites chroniques et 5.9% des transplantations aux Etats-Unis<sup>71</sup> et 2.6% en Europe<sup>70</sup>.

#### **4.6 Classification**

L'HAI est classée en deux types principaux selon la nature des autoanticorps retrouvés dans le sérum (Tableau 2) :

Le type 1, le plus répandu et commun dans le monde (environ 80% des cas), est caractérisé par des autoanticorps anti-noyau (« antinuclear » ANA) et/ou anti-muscles lisses (« smooth muscles antigen » SMA) dont l'actine est l'antigène principal<sup>16</sup>.

Le type 2 est caractérisé par la présence d'autoanticorps anti-microsomaux de foie et de rein de type 1 (« liver-kidney microsome type 1 » LKM1) dirigés contre la protéine CYP2D6 et/ou anti-cytosol de foie de type 1 (« anti-liver cytosol » LC1)<sup>41</sup> dirigés contre la formiminotransférase-cyclodésaminase (FTCD)<sup>56</sup>.

Il existe un troisième type, cependant très controversé et généralement non accepté<sup>41</sup>, nommé HAI de type 3, caractérisé par la présence d'autoanticorps contre les antigènes solubles de foie (« soluble liver antigen » - SLA). Ce type aurait une prévalence plus faible que le type 2, 90% de sexe féminin et un âge maximum entre 20 et 40 ans<sup>44</sup>.

**Tableau 2 : Les différents autoanticorps dans l'hépatite autoimmune de type 1 et 2<sup>39</sup>.**

Type	Autoanticorps associés	Occasionnellement présents
1 (classique)	Anti-noyaux	Anti-mitochondriales
	Anti-muscles lisses	Anti-antigènes solubles du foie
	Anti-actine	Anti-protéines du foie et pancréas
	Anti-récepteurs d'asialoglycoprotéine	Anti-neutrophiles cytoplasmiques
		Anti-cytosol du foie type 1 (rare)
2 (anti-LKM1)	Anti-LKM1	Anti-noyaux (rare)
	Anti-cytosol du foie type 1	Anti-antigènes solubles du foie
	Anti-récepteurs d'asialoglycoprotéine	

## 5. Hépatite Autoimmune de type 2

### 5.1 Définition et historique

En 1973, le groupe de Rizzetto a trouvé, par immunofluorescence indirecte, des autoanticorps réactifs sur des sections de foies et reins de rats<sup>44,64,72</sup>. Ces autoanticorps, nommés anti-réticulum endoplasmiques<sup>16</sup> ou anti-microsomes de foie et de rein de type 1 – anti-LKM1 (liver kidney microsome type 1), ont beaucoup été étudiés pendant les années 1987 à 1991<sup>73,74</sup>. Le nom « LKM1 » signifie que ces autoanticorps ne sont pas spécifiques à un organe en particulier contrairement aux autoanticorps anti-microsomes de thyroïde et d'estomac. Le terme « microsome », créé par Du Duve<sup>75</sup> désigne les vésicules arrondies provenant de la membrane du réticulum endoplasmique lisse et rugueux, broyée puis ressoudée après ultracentrifugation.

L'HAI de type 2 (HAI-2) est caractérisée par la présence de ces autoanticorps et peut aussi être caractérisée par les autoanticorps anti-LC1. À noter que ceux-ci sont présents dans 30% des cas d'HAI-2 et sont retrouvés comme étant les seuls autoanticorps présents chez 10% des patients<sup>42,76</sup>. Muratori *et al.* ont montré en 1998 qu'il y avait une bonne relation entre le titre d'autoanticorps LC1 et les dommages causés aux hépatocytes<sup>77</sup>.

### 5.2 Incidence, statistiques et démographie

Cette forme d'HAI, six fois plus rare que le type 1, survient beaucoup plus souvent chez les jeunes femmes et fillettes (âgées de 2 à 14 ans) que chez les garçons (prédominance féminine de 90%). Elle est plus sévère et sa progression est plus rapide que chez les patients atteints de l'HAI type 1 ou 3.<sup>16,55</sup> L'âge moyen à la découverte de la maladie chez la patiente est d'environ 6 ans, mais l'HAI-2 est aussi diagnostiquée chez les adultes, spécialement en Europe. Cinquante à 75% des cas d'HAI-2 sont des cas pédiatriques<sup>78</sup>. Une étude effectuée en 1992 a démontré qu'aucun sérum de

patients atteints de l'HAI-1 ne contenait d'autoanticorps anti-LKM1, confirmant ce marqueur comme caractéristique de l'HAI de type 2.<sup>79</sup>

### **5.3 Association avec d'autres maladies autoimmunes**

Les patients sont souvent co-atteints d'autres maladies autoimmunes, entre autres par le diabète de type 1 et par les thyroïdites autoimmunes. Ils ont aussi fréquemment des autoanticorps organes spécifiques, tels que des autoanticorps contre les cellules pariétales et les îlots de Langerhans.<sup>74</sup> On retrouve une prévalence de 30% de maladies autoimmunes extra hépatiques co-existantes<sup>80</sup> ; l'HAI-2 est présente chez 15% des patients atteints du syndrome polyglandulaire autoimmun de type 1 (SPA1).<sup>81</sup> Par contre, l'infection par le VHC amène plus fréquemment des manifestations de maladies autoimmunes systémiques comme la cryoglobulinémie et la glomérulonéphrite<sup>82</sup> (Figure 4).

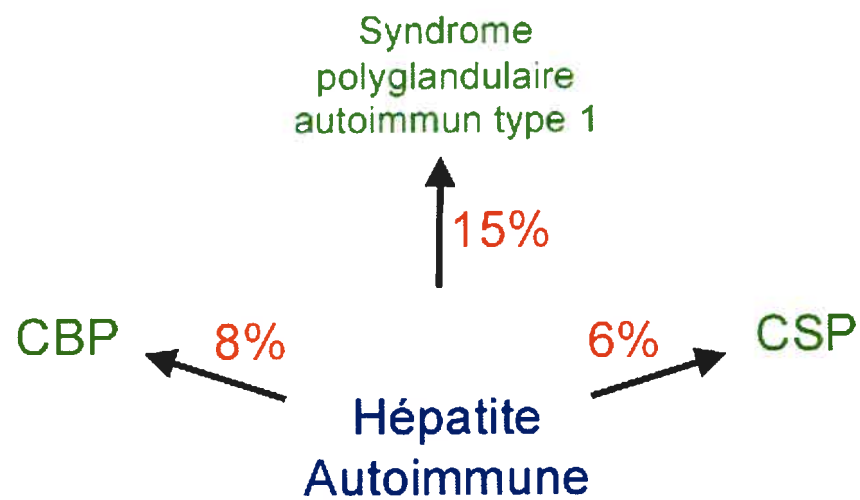
### **5.4 Facteurs de risque**

Tout comme les autres maladies autoimmunes, les prédispositions génétiques, s'il y en a, ne sont pas encore déterminées avec certitude<sup>83</sup>. Plusieurs articles suggèrent que les patients exprimant un HLA B8, DR3 ou DR4 ont de plus fortes chances d'être atteints<sup>4,43,44,80,83,84</sup>.

### **5.5 Pathogenèse**

La maladie comporte un plus haut taux de risques vers une progression en cirrhose que le type 1<sup>44,74</sup>. Tout comme le type 1, la maladie peut parfois se présenter sous une forme aiguë, même fulminante : le traitement est alors très important afin de limiter la progression de la maladie<sup>83</sup>.

Les sites antigéniques linéaires ou séquentiels sur le CYP2D6 ont été montrés. Les autoanticorps dirigés contre les épitopes conformationnels ont aussi été définis en mesurant leur capacité à inhiber le métabolisme de CYP2D6 pour la dextrométhorphan<sup>72</sup>. Les autoanticorps anti-LKM1 ont



**Figure 4 : Association de l'hépatite autoimmune avec d'autres maladies.** Le pourcentage représente la fréquence avec laquelle l'hépatite autoimmune est associée à d'autres maladies.

CBP : Cirrhose biliaire primaire

CSP : Cholangite sclérosante primitive



aussi la possibilité d'activer les lymphocytes T infiltrant le foie : ces observations suggèrent un mécanisme cellulaire et humoral pour le développement de l'HAI-2.

La liaison directe des autoanticorps aux membranes des cellules hépatiques mènerait à la lyse des cellules, causant donc des dommages au foie. Pour cela, il faudrait évidemment que la protéine CYP2D6 soit exprimée à la surface des hépatocytes <sup>64</sup>.

## **5.6 Immunohistochimie**

En utilisant des anticorps monoclonaux contre la surface des lymphocytes, l'analyse immunohistochimique de l'infiltration périportale dans le foie a révélé que 70% de l'infiltration était constituée de lymphocytes T<sup>85</sup>. Les cellules T CD8<sup>+</sup> prédominaient dans les régions où la nécrose hépatocellulaire était présente alors que les cellules T CD4<sup>+</sup> dominaient dans les tissus septaux. Quant aux cellules NK, elles étaient présentes uniformément sur la coupe de foie<sup>85</sup>.

## **5.7 Autoanticorps LKM1**

### **5.7.1 Description et historique**

Les autoanticorps anti-LKM1 ont une forte réactivité avec les cytoplasmes d'hépatocytes de foies et les tubes proximaux de reins de rats. Il a été démontré par la suite que ces autoanticorps se liaient au réticulum endoplasmique rugueux et lisse <sup>86</sup>. En 1985, les groupes d'Alvarez *et al.*<sup>87</sup> et de Kyriatsoulis *et al.*<sup>88</sup> en 1987 ont indiqué que les sérums LKM<sup>+</sup> de patients ayant l'HAI reconnaissaient une protéine microsomale de 48kDa par immunoblot. Les autoanticorps ont donc été nommés LKM de type 1, contrairement au type 2 présent dans l'hépatite induite par les drogues<sup>13</sup>. Plusieurs groupes ont par la suite trouvé que les sérums réagissaient avec des préparations purifiées de protéine cytochrome P450<sup>89</sup>. Dans les années qui suivirent, le P450 2D6 fut identifié comme l'antigène reconnu par ces

autoanticorps. Il a été démontré *in vitro* qu'il était possible d'inhiber l'activité enzymatique de CYP2D6 pour l'hydroxylation du bufuralol, un substrat de CYP2D6 dans les microsomes du foie et de la spartéine, une drogue anti-arythmique, par l'ajout d'autoanticorps LKM1<sup>64,90,91</sup>. Les autoanticorps semblent cependant ne pas pénétrer dans les cellules intactes du foie pour inhiber les fonctions enzymatiques *in vivo*<sup>64,92</sup>.

Comme mentionné, la détection des autoanticorps anti-LKM1 se fait très facilement par immunofluorescence sur des coupes de foie. Le cytoplasme de l'ensemble des hépatocytes est marqué par le fluorochrome choisi alors que le noyau ne l'est pas<sup>16</sup>. C'est la méthode de détection habituelle pour ces autoanticorps. L'alternative serait l'immunoprécipitation : c'est une méthode simple, peu coûteuse et sensible. Parmi les autres méthodes utilisées, mais beaucoup moins répandues, citons l'immunoblot, l'inhibition de l'activité enzymatique de CYP2D6 et la technique radio-immunologique<sup>12</sup>. Toutes ces méthodes donnent des résultats très variables : par exemple, dans les cas des patients infectés par le VHC, les ELISA et immunoblots utilisant des fractions microsomales de foie ou une protéine recombinante de CYP2D6 détectent seulement 30% des sérums qui sont normalement positifs par immunofluorescence indirecte (IFI)<sup>93</sup>.

Étant donné les grandes différences de détection selon les méthodes utilisées, Yamamoto et al. ont alors évalué un essai d'immunoprécipitation de radio-ligand en utilisant la molécule de CYP2D6. Ce test, applicable pour le diagnostic et le suivi de l'HAI-2 et le VHC, est plus sensible que l'IFI, plus simple techniquement et plus spécifique pour l'autoanticorps anti-LKM1 chez les patients avec HAI-2 et les VHC positifs<sup>72</sup>.

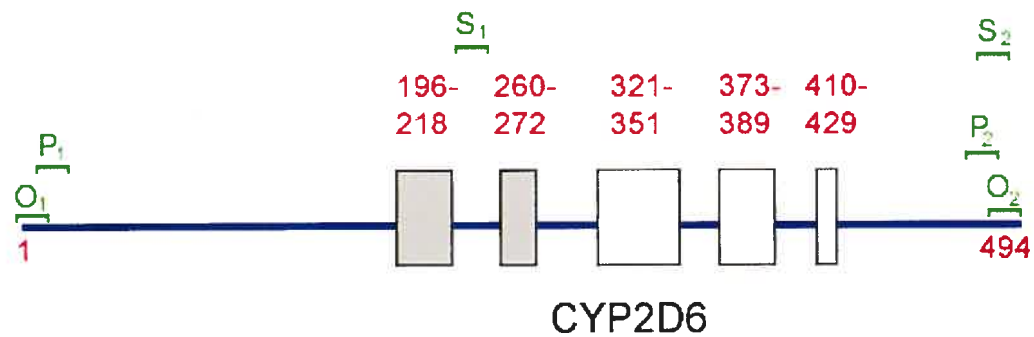
### 5.7.2 Épitopes

Les sérums de patients pédiatriques souffrant d'HAI-2 reconnaissent cinq sites antigéniques linéaires sur la molécule CYP2D6, essentiellement les régions 196-218, 260-272, 321-351, 373-389 et 410-429 (Figure 5). La région 257-269 (EHRMTWDPAQPPR), la plus fréquemment reconnue, semble être spécifique aux autoanticorps anti-LKM1 associés à l'HAI-2. La séquence TWD (Thr, Try, Asp) aux positions 261-263 est importante pour le site antigénique puisque lorsque mutée, elle n'est plus reconnue par les sérums de patients LKM1<sup>+</sup><sup>94</sup>. Le site 321-351 quant à lui est le deuxième site le plus reconnu par les sérums LKM1<sup>+</sup>. Selon certaines prédictions, il y aurait deux peptides antigéniques dans ce site, soit les séquences d'acides aminés 321-339 et 340-351<sup>95-97</sup>. Il y aurait aussi plusieurs sites secondaires identifiés sur la partie C-terminale du CYP2D6<sup>98</sup>. L'analyse de la spécificité des autoanticorps révèle aussi la présence d'épitopes conformationnels sur la molécule.

## 5.8 Cytochrome P450 2D6

### 5.8.1 Définition

Le cytochrome P450 2D6, un enzyme microsomal autrefois nommé P450 buf I, P450 IID1 puis P450 db1, est une mono-oxygénase non glycosylée de la famille des cytochromes P450<sup>16,35,84</sup> et a une masse moléculaire de 48kD<sup>72</sup>. Il catalyse la réaction oxydative de plus de 25 drogues et médicaments divers dans les microsomes<sup>13,64,92,99</sup>. La famille des cytochromes P450 constitue 90% des enzymes de la phase 1 du métabolisme des drogues qui introduisent un groupement fonctionnel, habituellement un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH), dans des substrats endogènes et exogènes. Récemment, quelques autres protéines de type P450 ont été identifiées comme étant des cibles immunogéniques dans l'HAI et l'autoimmunité hépatique<sup>100</sup>.



**Figure 5 : Épitopes linéaires des autoanticorps anti-LKM1 retrouvés sur le cytochrome P450 2D6.** Les épitopes 196-218 et 260-272 sont reconnus beaucoup plus fréquemment chez les patients HAI-2 que chez les patients VHC<sup>+</sup>.

Les positionnements des amorces O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sont représentés en vert sur la figure.

### 5.8.2 Mécanisme

L'expression de CYP2D6 est associée à un contrôle d'un polymorphisme génétique, plus précisément le polymorphisme débrisoquine/spartéine. Son activité enzymatique varie beaucoup selon ce polymorphisme. Elle varie du phénotype « complètement déficient », associé à l'allèle CYP2D6\*5, jusqu'au phénotype « métaboliseur excessif » associé à l'allèle CYP2D6\*1<sup>99</sup>. Il existe au moins 21 variations d'allèles pour CYP2D6, allant de la délétion complète, d'une duplication du gène, d'une mutation unique d'un nucléotide, dispersées sur presque tous les 9 exons de CYP2D6<sup>101,102</sup>. Cinq à 10% de la population caucasienne est dépourvue d'un CYP2D6 fonctionnel résultant en une faible métabolisation des substrats<sup>13,64</sup> et un niveau indétectable de protéine dû à un pré-ARNm incorrectement épissé<sup>92</sup>. Ce pourcentage est assez variable puisqu'il est de 1% au Japon et 12% en Europe du Nord. Plusieurs papiers, dans la littérature, font mention d'une variation dans la fréquence de l'allèle dans différents groupes ethniques<sup>103-106</sup>. En Europe, 71% des Caucasiens ont un groupe fonctionnel d'allèles, celui-ci diminuant à 50% pour les Asiatiques et les africains<sup>77</sup>. Une étude a démontré premièrement que CYP2D6 est présent et fonctionnel dans le foie des patients LKM1<sup>+</sup>, a un poids moléculaire tel qu'attendu et ne démontre aucun signe d'anomalie au niveau du gène codant<sup>95</sup>. Deuxièmement, les autoanticorps anti-LKM1 inhibent l'activité de CYP2D6 *in vitro* mais pas *in vivo* et troisièmement, l'expression de CYP2D6 dans les hépatocytes est un pré requis pour le développement et le maintien de la réponse des autoanticorps anti-LKM1<sup>64,107</sup>.

### 5.8.3 Expression

CYP2D6 est exprimé dans les hépatocytes, plus précisément dans le réticulum endoplasmique<sup>108</sup>. Son expression pourrait être régulée par des cytokines (interleukine 1 et 6, facteur de nécrose tumoral (TNF))<sup>109</sup> et diminue *in vitro* de 60-70% suivant une courte période de temps. Certaines études démontrent que CYP2D6 serait présent à la surface des hépatocytes : plusieurs évidences démontrent qu'une grande quantité de vésicules partent

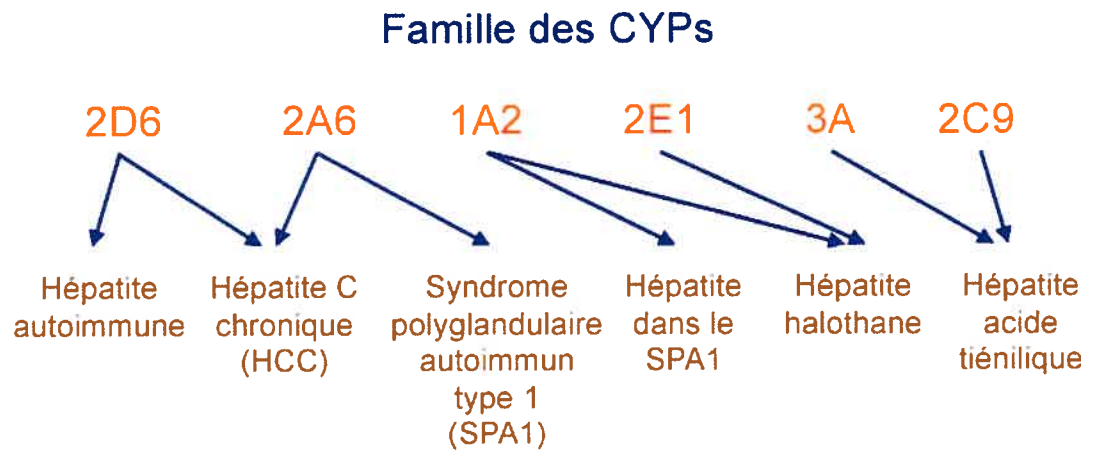
du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Ces vésicules emportent avec elles des protéines, dont le CYP2D6, pour finir à la membrane plasmique et s'y fusionner, dévoilant donc la molécule de CYP2D6 à la surface<sup>110</sup>. Loeper et al. ont démontré que CYP2D6 humain exprimé dans la levure se retrouve à la surface externe de la membrane plasmique et est totalement fonctionnel<sup>111</sup>. Muratori *et al.* ont démontré l'expression de CYP2D6 à la surface des hépatocytes non-traités<sup>112</sup>. Premièrement, le marquage d'hépatocytes avec la fluorescéine n'était positif que pour les sérums LKM1<sup>+</sup> et non les contrôles. Ce marquage pouvait être aboli par adsorption au préalable avec un CYP2D6 humain recombinant. Deuxièmement, un double marquage montrait que les anticorps anti-CYP2D6 co-localisaient avec les autoanticorps anti-LKM1<sup>112</sup>. Le groupe d'Alvarez n'est toutefois pas d'accord à propos de l'expression à la surface<sup>95</sup>. Selon leurs expériences en immunofluorescence sur des hépatocytes, aucune fluorescence à la surface de ces hépatocytes n'est mise en évidence. Dans un commentaire, Cerny affirme que la présence d'autoanticorps anti-LKM1 est une conséquence plutôt que la cause de l'HAI-2 ; ils seraient des marqueurs et non des agents de destruction<sup>113</sup>.

#### **5.8.4 Antigénicité**

Le domaine N-terminal de CYP2D6, constitué des acides aminés 1-193, semble être dépourvu d'antigénicité en ce qui a trait aux autoanticorps anti-LKM1, puisque aucun site de liaison n'a été trouvé. Le domaine C-terminal, comprenant les acides aminés 193-497, constitue la zone principale de réactivité des autoanticorps LKM1<sup>91</sup>.

#### **5.8.5 Famille des CYP450**

La famille des cytochromes P450 est impliquée dans plusieurs maladies hépatiques (Figure 6). Par exemple, CYP1A2 est associé à l'hépatite dans le syndrome polyendocrine autoimmun de type 1, un désordre autosomal récessif rare composé de divers symptômes, débutant dans l'enfance<sup>114</sup>.



**Figure 6 : Famille des cytochromes P450 et leurs implications dans diverses maladies.** La figure ne représente qu'une partie des cytochromes impliqués dans diverses maladies. *Données tirées et adaptées de la référence 78.*

CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme oxydatif de l'halothane (anesthésiant) et est la cible dans l'hépatite induite par cette drogue où des autoanticorps contre cette molécule sont retrouvés<sup>115,116</sup>.

### **5.9 Hypothèse : Mimétisme moléculaire**

Certaines des séquences des épitopes reconnus par les autoanticorps anti-LKM1 (par le fait même les séquences correspondantes sur sa cible CYP2D6) sont similaires à des séquences situées sur le génome du VHC<sup>35</sup>. Un mécanisme a donc été proposé pour expliquer l'induction de l'autoimmunité chez certains patients infectés par le VHC : le mimétisme moléculaire entre CYP2D6 et le VHC.

Les récepteurs d'une cellule B ou T reconnaissent les antigènes par liens non covalents entre les sites de liaisons des récepteurs et les épitopes sur les antigènes. Par conséquent, du point de vue de la cellule, deux ligands qui activent le même récepteur sont biologiquement identiques, peu importe le degré de différence au niveau chimique. Le mimétisme est donc un fait moléculaire<sup>117,118</sup>.

Selon la théorie de la sélection clonale de l'immunité acquise, le répertoire des récepteurs doit être purgé de tous les clones T qui reconnaissent des antigènes du soi. L'activation des lymphocytes par mimétisme moléculaire, entre divers agents infectieux et les antigènes du soi, est une des possibilités causant les maladies autoimmunes. Notre répertoire de clones T, normalement dépourvu des clones autoréactifs, peut être déjoué par une infection virale qui présentera au système immunitaire des épitopes semblables à certains autoantigènes. L'infection réveillera les clones T associés à ces épitopes, ce qui aura aussi pour conséquence l'attaque des autoantigènes (ex. cellules du foie). Le VHC et CYP2D6 en sont un bon exemple<sup>119</sup>. Il existe aussi plusieurs exemples de ce genre, comme le cas du



diabète insulino-dépendant et le virus Coxsackie<sup>120</sup> ou le cytomégalovirus<sup>121</sup> et le virus de l'herpes simplex et la kératite.<sup>122,123</sup>

### 5.10 HAI-2 et VHC

Les autoanticorps anti-LKM1 ne sont pas complètement spécifiques à l'HA1-2, mais sont aussi présents chez certains patients infectés par le VHC<sup>99</sup>. L'ARN du virus de l'hépatite C (VHC) est détectable dans une certaine proportion de patients LKM1<sup>+</sup><sup>35</sup>. D'autre part, certains sérums de patients (majoritairement des hommes) adultes VHC<sup>+</sup> contiennent des autoanticorps anti-LKM1<sup>72,98</sup>. Les patients atteints de l'HA1-2 sont donc classés en deux groupes cliniques, selon la présence ou l'absence du VHC. Ces deux groupes constituent 2 types de maladies différents. Ces derniers, LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>-</sup>, ont une maladie autoimmune du foie plus typique, alors que les patients LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup> sont plus âgés, en grande partie du sexe masculin et ont une maladie hépatique moins sévère<sup>35</sup>. Les autoanticorps anti-LKM1 présents chez les patients LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>-</sup> sont plus homogènes, leurs titres plus élevés et les autoépitopes majeurs sur CYP2D6 sont surtout linéaires. Quant aux patients LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup>, ils sont plus hétérogènes et ils ont une grande variété d'autoépitopes, beaucoup d'entre eux étant seulement conformationnels<sup>42,64</sup> (Tableau 3). Plusieurs études supportent ces faits<sup>124-127</sup>. Par exemple, la région 181-245 de CYP2D6 est plus souvent reconnue par les autoanticorps des patients LKM1<sup>+</sup>/HCV<sup>-</sup> que par les patients LKM1<sup>+</sup>/HCV<sup>+</sup><sup>98</sup>. Les épitopes reconnus par les LKM1 entre les deux types de maladies diffèrent<sup>93,128</sup>. De plus, la région 316-327 permettrait de faire la différence entre les autoanticorps anti-LKM1 issus d'une hépatite autoimmune ou d'une infection par le VHC. Cette région de 12 a.a. est exposée à la surface de la molécule<sup>129</sup>.

Les autoanticorps LKM1 sont surtout de sous-classe IgG1 chez les patients VHC<sup>+</sup> tout comme c'est le cas des patients VHC<sup>-</sup>. Le sous-type d'IgG ne peut donc servir à différencier les deux groupes<sup>130</sup>. De nos jours, les autoanticorps

**Tableau 3 : Différences entre les patients atteints de l'HAI-2 ou VHC<sup>+</sup>/LKM1<sup>+</sup>, ainsi que leurs épitopes anti-LKM1.**

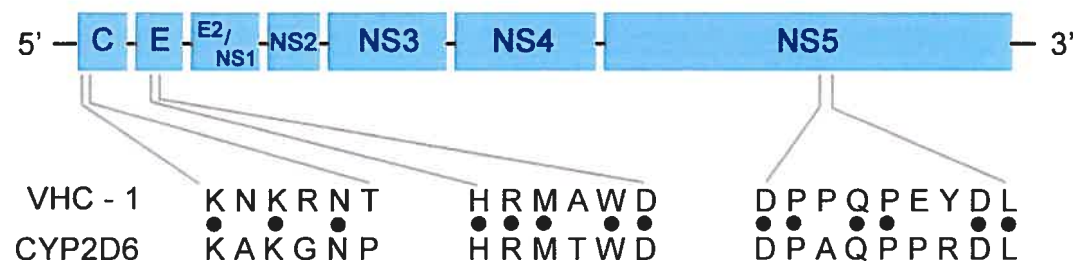
	Hépatite Autoimmune type 2	Infection VHC chronique LKM1 <sup>+</sup>
Âge au début	Majoritairement pédiatrique	Adulte
Sexe	90% féminin	-
ALT	+++	+
Titre LKM1	+++	+++
Effet de l'immunosuppression	+++	-
Effet de l'interféron	Détérioration	+
HLADR3	++	+
Anti-VHC/ARN-VHC	-	+
<b>Anticorps LKM1</b>		
Prévalence	78%	1,5%-10%
Titre >= 160	96%	48%
Inhibition enzymatique	+	+
Conformationnels	Fréquent	Très fréquent
Linéaires	100%	33%
aa 196-218	0%	62%
aa 260-272	93%	0%
aa 272-281	0%	50%
aa 281-301	0%	37%
aa 301-321	0%	50%
aa 321-351	53%	87%
aa 373-389	6%	0%
aa 410-429	13%	0%

\* Données tirées en partie de la référence 135.

anti-LKM1 sont couramment utilisés comme marqueurs de diagnostics pour l'HAI-2. Ma *et al.*<sup>127</sup> illustrent que 72% de leurs patients atteints de l'HAI-2 réagissaient contre la forme dénaturée du CYP2D6, alors que pour les patients LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup> ce chiffre n'était que de 27%. Ces résultats sont supportés par ceux de Yamamoto *et al.*<sup>95</sup> (91% vs 27%), mais contredits par Manns *et al.*<sup>131</sup>, qui rapportent une réactivité indépendante du statut VHC. Ma *et al.*<sup>127</sup> expliquent ce fait par la différence au niveau des patients étudiés (hommes [Manns] vs femmes [Ma], titre de LKM1, méthodes).

*In vitro*, les clones T dérivés du sang et tissus de patients atteints de l'HAI démontrent une prédominance du type CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, comparés aux clones T accumulés dans le foie de patients atteints de l'hépatite C chronique active<sup>132</sup>. Löhr *et al.* ont démontré que les clones T qui infiltraient le foie chez les patients atteints de l'HAI-2 reconnaissent un antigène (le même épitope principal que pour les autoanticorps anti-LKM1) qui comportait la région immunodominante de 33 a.a. de CYP2D6 (a.a. 254-285)<sup>133</sup>. La réponse cellulaire T de l'HAI-2 contribuerait donc aux dommages causés lors de la maladie<sup>63,134</sup>. L'augmentation des molécules HLA classe I et II avec une localisation importante de cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dans les infiltrations de lymphocytes dans le foie suggèrent que la réponse immunitaire cellulaire orchestre l'HAI. Löhr *et al.* ont montré dans un papier datant de 1996 que tous leurs patients atteints de l'HAI-2 reconnaissent le peptide de la région 263-285 du CYP2D6<sup>134</sup>.

Plusieurs séquences homologues existent entre CYP2D6 et le VHC, certaines allant jusqu'à 70% d'homologie, d'où l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre l'HAI-2 et le VHC. Comme exemple, citons KNKRNT, KAKGNP, HRMAWD, HRMTWD, DPPQPEYDL et DPAQPPRDL<sup>35</sup> (Figure 7).



**Figure 7 : Quelques homologies entre le VHC et le CYP2D6.**

La réponse proliférative des cellules T chez les patients souffrant d'une HAI est inversement proportionnelle à l'amélioration clinique des patients étudiés après le début d'un traitement immunosuppresseur<sup>135</sup>.

Il a été rapporté que la prévalence de l'association du VHC et d'une réactivité autoimmune chez les patients variait énormément, soit 50% en Allemagne et en France, autour de 90% en Italie et au Japon et moins de 10% en Angleterre<sup>78,136</sup>. En revanche, selon certains papiers, moins de 2% des personnes infectées par le VHC ont des autoanticorps anti-LKM1<sup>137-139</sup>. Selon d'autres, ce chiffre fluctue de 0% à 10%<sup>80,131,138,140</sup>. La faible incidence de la présence d'autoanticorps anti-LKM1 chez les personnes VHC<sup>+</sup>, en dépit de la haute prévalence des infections par le VHC peut être expliquée par : 1) une souche spécifique du VHC, 2) une séquence spécifique ou 3) une susceptibilité spécifique de l'hôte à l'autoimmunité induite par un virus. Dans leurs recherches, le groupe de Michitaka a étudié la relation entre l'apparition des autoanticorps anti-LKM1 et les différents génotypes du VHC d'un groupe de patients en Allemagne et en Italie<sup>35</sup>. Ils ont trouvé que le génotype 3 était plus fréquemment retrouvé chez les Italiens (et non pas chez les Allemands) avec des autoanticorps LKM1. Une séquence du génotype 3 (de la région NS1/E2) [EHRLT] aurait une homologie avec un des épitopes majeurs du CYP2D6 (EHRMT) non-présente sur le génotype 1, 2 et 4<sup>35</sup>.

Les traitements de l'HAI-2 et des patients LKM1<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup> diffèrent : si l'interféron  $\alpha$  est efficace pour combattre le VHC, il peut aggraver la maladie chez les patients atteints de l'HAI-2. Il est donc important de bien identifier la présence ou l'absence de l'hépatite autoimmune avant la prescription d'un traitement.<sup>140</sup>

### **5.11 Traitement de l'HAI-2**

Malgré l'hétérogénéité de la maladie, l'HAI répond généralement bien aux thérapies avec corticostéroïdes (corticothérapie)<sup>55,67</sup> et aux traitements

immunosuppresseurs en général<sup>16</sup>. Le taux de rémission est d'approximativement 80% et est inversement proportionnel au degré de sévérité histologique de la maladie<sup>141</sup>. Le 20% de sujets pour lesquels la thérapie n'est pas efficace comporte beaucoup de patients ayant une cirrhose établie, un bas âge ou un long laps de temps entre le début de la maladie et l'instauration du traitement. Les patients dont le génotype est HLA-B8 ou HLA-DR3 sont aussi plus à risque d'un échec du traitement puisque le génotype HLA-DR3 est associé à un taux de rémission plus faible et à plus de rechutes<sup>44</sup>. Lorsque les patients arrêtent leur traitement suite à une amélioration de leur condition, 50% d'entre eux restent en rémission. La période de temps de rémission peut varier de quelques mois à plusieurs années, les patients en rechute doivent suivre la thérapie à très long terme<sup>55</sup>.

Le médicament habituel pour le traitement est la prednisolone<sup>142,143</sup>. Ce traitement est mal toléré dû aux effets secondaires dans 35% des cas<sup>144</sup>. Malgré ce traitement, 40% à 55% des patients vont tout de même développer une cirrhose après 10 ans de traitement<sup>145</sup>. Il y a donc d'autres médicaments accessibles dont la cyclosporine (inhibe l'activation des cellules T auxiliaires primaires) qui est normalement utilisée lors des transplantations<sup>146</sup>. Elle a été étudiée plus en détail comme traitement alternatif<sup>147</sup>. Une étude a été effectuée rétrospectivement chez trois groupes d'enfants : avant tout autre traitement, pendant une thérapie par corticostéroïde et après une thérapie infructueuse. La rémission a été obtenue chez tous les enfants des trois groupes (les taux d'ALT dans le sérum sont retournés à la normale) après 1 à 6 années de traitement<sup>148</sup>. La cyclosporine est donc capable d'induire la rémission chez les enfants atteints de l'HAI-2, avec ou sans prétraitement, ne causant que quelques effets secondaires très limités chez certains patients<sup>149</sup>.

Un autre médicament, l'azathioprine, est efficace pour maintenir la rémission lorsqu'elle est déjà obtenue à l'aide des corticostéroïdes ou cyclosporine.<sup>44</sup> Lorsqu'il est parti du traitement initial, les signes d'un traitement efficace

apparaissent entre le premier et le troisième mois du début de la prise du médicament et se notent par une diminution des niveaux d'aminotransférases et de globulines dans le sérum et une diminution de la réponse cellulaire T dirigée contre les hépatocytes du foie<sup>64</sup>.

Même si le traitement ne procure pas une guérison permanente, il peut néanmoins prolonger la vie des patients. La durée de vie des patients traités par rapport aux personnes saines, âge et sexe comparé, est similaire<sup>150</sup>. Au niveau des transplantations, les patients atteints de l'HAi ont d'excellents taux de survie : celui-ci excède 85%<sup>151</sup>.

Les traitements par l'interféron  $\alpha$  de l'hépatite C sont à déconseiller fortement pour les patients qui sont aussi des LKM1<sup>+</sup> même si aucun signe de gravité de la maladie hépatique n'est apparent. Selon une étude effectuée sur plusieurs patients, la thérapie par l'interféron  $\alpha$  pourrait provoquer l'aggravation de la maladie hépatique ainsi que le déclenchement d'autres maladies autoimmunes<sup>152</sup>. Il est alors crucial de bien s'assurer que les patients traités par l'interféron  $\alpha$  ne présentent aucun symptôme de maladie autoimmune et de continuer le suivi lors du traitement.

## Objectifs et plan de la recherche

Ce projet vise à étudier et démontrer un mimétisme moléculaire dans les épitopes T entre le VHC et le CYP2D6. L'hypothèse de départ de ce projet est que certaines composantes de la réponse cellulaire antivirale contre le virus de l'hépatite C (VHC) sont dirigées contre les antigènes du soi (mimétisme moléculaire). Nous avons donc tenté de la vérifier en établissant 3 objectifs principaux.

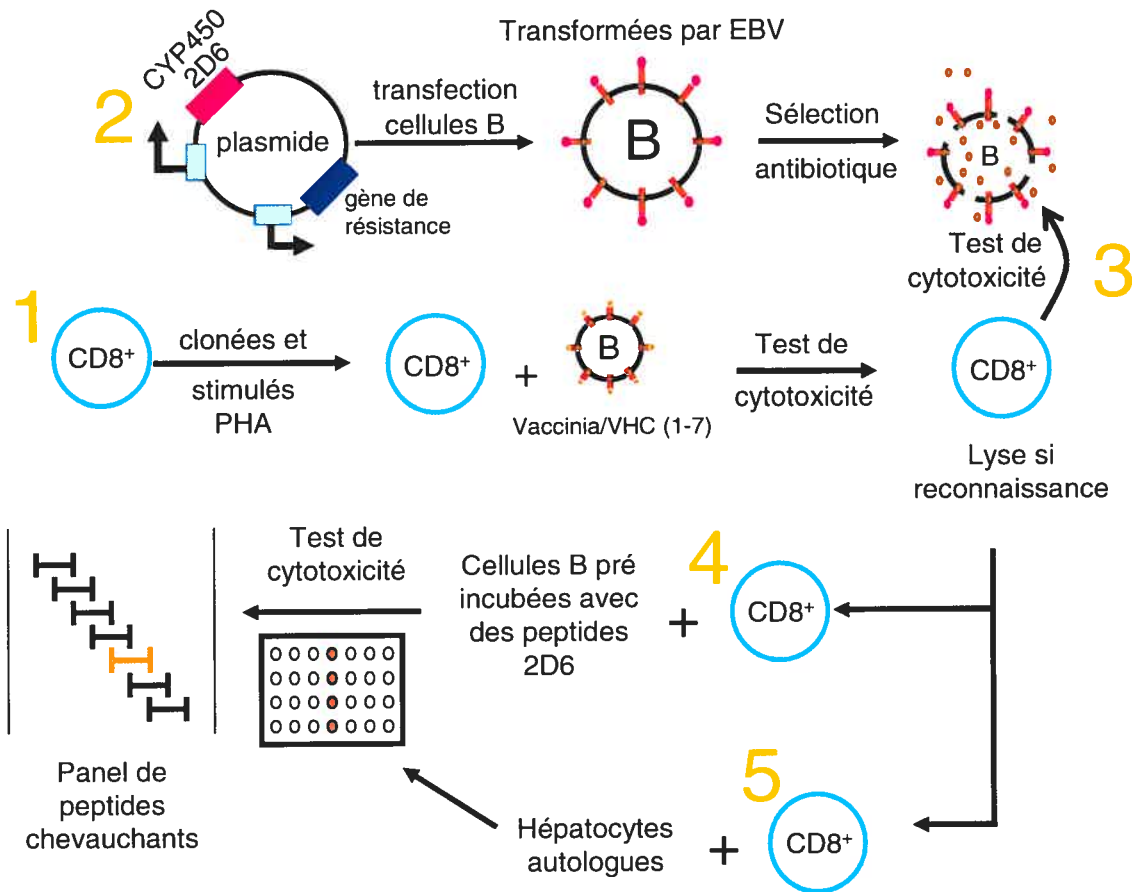
- 1) Identifier les autoantigènes et les clones de lymphocytes T responsables du déclenchement et de l'exacerbation de l'autoimmunité hépatique.
- 2) Mieux comprendre la relation entre le VHC et la réponse autoimmune.
- 3) Déterminer s'il y a mimétisme immunitaire entre la/les protéine/s du VHC et le CYP2D6.

Le schéma général du projet est illustré à la figure 8 et expliqué à la section « Résultats et discussion ».



**Figure 8 : Résumé général du projet.**

1. Clonage de cellules T isolées par gradient de Ficoll et test de cytotoxicité (cibles : lignées de cellules B transformées par EBV (BLCL) et infectées au moyen de recombinants vaccinia exprimant diverses parties de la polyprotéine du VHC).
2. Construction du vecteur et transfection de CYP2D6 dans les BLCL autologues.
3. Test de cytotoxicité des cellules CD8<sup>+</sup> VHC-spécifiques sur les cellules B transfectées.
4. Caractérisation de la spécificité antigénique des cellules reconnaissant CYP2D6 au moyen d'un panel de peptides chevauchants.
5. Test de cytotoxicité sur les hépatocytes autologues.



## Matériels et méthodes

### Patients

Les patients VHC<sup>+</sup> proviennent d'une collaboration avec le Dr Marc Bilodeau de l'hôpital St-Luc à Montréal. Les échantillons des patients obtenus proviennent de donneurs consentants, de tous âges et provenances, qui ont des hépatites chroniques. Les causes possibles de l'infection par le VHC sont variées : transfusions sanguines, échanges de seringues, etc. Ce groupe n'a pas d'autoanticorps LKM1 et constitue le contrôle négatif. L'infection par le VHC a été diagnostiquée par RIBA et/ou PCR de seconde génération<sup>153</sup>.

Le patient HAI001 diagnostiqué LKM1<sup>+</sup> par immunoprécipitation et immunobuvardage, a été suivi à l'Hôpital Ste-Justine. Il est de sexe masculin et était âgé de 18 ans lors du prélèvement sanguin.

Tous les patients de l'étude ont consentis, par l'entremise d'un document explicatif, à ce que les échantillons de sang et les biopsies de foie soient prélevés et utilisés au cours de cette étude. Le projet a été soumis et accepté par le comité d'éthique du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine.

### Extraction des lymphocytes à partir du sang périphérique et du foie

Les lymphocytes ont été isolés par centrifugation sur un gradient de ficoll comme décrit par le fabricant (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Environ 20 ml de sang sont prélevés et dilués avec 20 ml de milieu de culture RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Burlington, Ontario) contenant 10% de sérum foetal de veau (FBS) (Gibco Invitrogen, Burlington, Ontario) et 500 µl de gentamicine (Gibco Invitrogen, Burlington, Ontario). Chaque 20 ml de sang dilué est déposé délicatement sur 15 ml de ficoll, puis centrifugé (sans frein) à une vitesse de 1500 x g pendant 30 min. L'interface blanche contenant les lymphocytes est alors récupérée et lavée deux fois avec du milieu RPMI 1640 10% FBS. Les cellules sont comptées puis

congelées dans un mélange de FBS 90% et 10% dimethyl sulfoxide à -80°C et éventuellement transférées dans l'azote liquide.

Afin d'isoler les lymphocytes d'un foie (obtenu par le biais de l'Hôpital St-Luc, laboratoire du Dr Marc Bilodeau), un morceau de foie est découpé en petits morceaux d'environ 5 mm. Ceux-ci sont ensuite écrasés chacun à leur tour dans un filtre 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA) à l'aide du presseur du piston d'une seringue de 60 ml. L'écrasement dans le filtre se fait dans un fond de pétri contenant déjà du milieu RPMI 1640 + 10% FBS. Toutes les fractions de milieu contenant les lymphocytes provenant des morceaux écrasés sont mises en commun dans un tube Falcon de 50ml. Une centrifugation à 1500 x g pendant 30 min sur gradient de percoll (Armstrong, densité 1,131 g/ml) est ensuite effectuée afin de séparer les lymphocytes des autres cellules et débris cellulaires.

### **Transformation par le virus d'Epstein Barr**

Afin de travailler avec les lymphocytes B provenant des patients, nous devons d'abord les immortaliser à l'aide du virus d'Epstein Barr (VEB) qui permet d'obtenir une lignée stable. Le VEB 10X est obtenu en centrifugeant une culture de cellules B95-8<sup>155</sup> dont la mortalité est de plus de 50%. Une fois le culot brisé, le surnageant est passé à travers d'un filtre de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA) et centrifugé (Beckman Coulter, Avantis J-25I, Ontario, Canada) à 20,000 x g pendant 2 heures, puis resuspendu dans un volume approprié de RPMI 1640 + 10% FBS. Aux 500,000 cellules à transformer, 500 µl de surnageant 10X sont ajoutés, puis incubées à température de la pièce pendant 1 heure. Vingt µl de cyclosporine 1 mg/ml (Neoral 100 mg/ml) (Novartis, Dorval, Québec.) sont ajoutés afin de prévenir la croissance des cellules T. Le tout est transféré dans un flacon T-25 (Falcon, Montréal, Canada). Cinquante pourcents du milieu est renouvelé 2 fois par semaine.

### **Congélation et décongélation de cellules**

Lorsque nous obtenions des échantillons de sang, nous avons isolé les lymphocytes et congelés pour une utilisation ultérieure. La congélation des cellules s'effectue à  $5 \times 10^6$  cellules par ml. Les cellules sont centrifugées à  $1,500 \times g$  pendant 8 min et resuspendues dans un mélange de FBS 90% et 10% dimethyl sulfoxide froid. Elles sont immédiatement transférées dans les tubes préalablement sur glace, le tout est ensuite rapidement placé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les cellules à décongeler sont amenées à  $37^{\circ}\text{C}$  dans un bain, puis placées dans un tube 50 ml. Trente ml de milieu de culture RPMI 1640 + 20% FBS sont ajoutés, en commençant goutte à goutte et graduellement plus vite après 5 ml. Les cellules sont centrifugées 8 min à  $1500 \times g$  ( $T^{\circ}$  pièce) et resuspendues dans le volume voulu de RPMI 1640 + 20% FBS.

### **Clonage de lymphocytes T**

Une fois les lymphocytes extraits par Ficoll, nous les avons utilisés lors de clonages afin de générer des micropopulations monoclonales qui seront testées contre les antigènes de CYP2D6 et ceux du virus de l'hépatite C. Tout d'abord,  $5 \times 10^6$  cellules nourricières (irradiées à 3000 rad), composées de PBMC d'un donneur sain, ont été distribuées (dans un milieu de culture) dans chacune des 11 plaques à fonds ronds (Falcon, Montréal, Canada) utilisées. Ce milieu est composé de RPMI 1640 + 20% FBS + 20% Interleukine-2 (IL-2 humain, 10 000U/50ml, Roche, Laval, Québec) et 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de PHA (Sigma, St-Louis, MO). La 11<sup>ème</sup> plaque, soit le contrôle négatif, n'aura que des cellules nourricières qui ne doivent pas pousser. Les 10 autres plaques auront chacune des quantités variables de cellules T diluées (1x50, 1x25, 2x10, 3x5 et 3x2 cellules par puits) dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu (RPMI 1640 + 20% FBS + 20% IL-2) par puits, ajoutées aux 100  $\mu\text{l}$  (cellules nourricières) déjà présents. Le milieu sera changé pour la première fois 4 jours après, en remplaçant 90  $\mu\text{l}$  d'ancien milieu avec 110  $\mu\text{l}$  de milieu frais (RPMI 1640 + 20% FBS + 20% IL-2). Les remplacements suivants se font

aux 3 jours. Dès l'apparition de micropopulations, celles-ci sont transférées sur de nouvelles plaques afin de ne garder que celles qui ont poussé. Chaque micropopulation est divisée en 6 puits sur les nouvelles plaques et laissée en culture encore quelques jours. Le test de cytotoxicité sera effectué dès que la majorité des micropopulations monoclonales seront assez grosses (approximativement 21 jours).

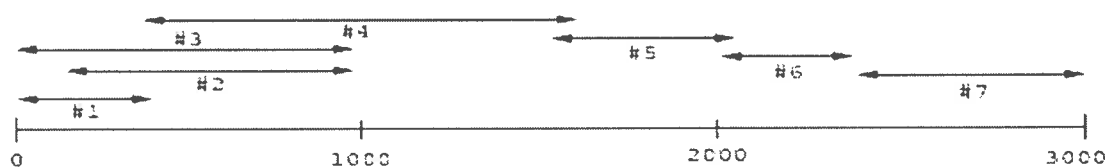
### **Test de cytotoxicité**

Les micropopulations monoclonales obtenues lors des clonages ont été par la suite testées contre diverses cibles du VHC. *Jour -1* : Une journée avant le test, les cellules cibles doivent être infectées par des recombinants vaccinia. 500,000 cellules par cible, pour un total de 7 cibles exprimant chacun une partie du génome du VHC (Figure 9), sont centrifugées à 1300 rpm pendant 10 min et le surnageant est enlevé. Pendant ce temps, les recombinants vaccinia sont soniqués (Aquasonic modèle 550T, VWR Scientific, Montréal, Canada) afin que les virus ne forment pas d'agglomérats et sont ajoutés aux cellules correspondantes dans des tubes de 15 ml. Les tubes sont placés à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 45 min, tout en agitant légèrement à tous les 15 min. Par la suite, on ajoute 2 ml de milieu RPMI 1640 + 10% FBS et le tout est transféré dans des flacons T-25 avec filtres et laissé 16 heures à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

*Jour 1* : Ajouter 6 ml de milieu RPMI 1640 + 10% FBS dans chacun des flacons T-25 et transférer individuellement dans des tubes de 15 ml. Centrifuger 10 min à 1500 rpm et enlever le surnageant au complet. Resuspendre dans 100 µl d'une solution radioactive de chromate de sodium <sup>51</sup>Cr (Perkin-Elmer, Boston, MA) et placer à 37°C pour 1 heure, en agitant légèrement à toutes les 10 min. Pendant ce temps, les effecteurs sont ajoutés à chaque cible dans 100 µl/puits (96 micropopulations à tester par plaque avec fonds en « V ») de milieu. Une fois l'heure terminée, les cellules cibles radioactives sont centrifugées et lavées 3 fois avec du milieu non

**Figure 9 : Caractéristiques des recombinants vaccinia utilisés et localisation graphique des différents peptides couvrant le VHC<sup>156</sup>.**

Cible #	Nom	Acides aminés VHC
1	Sc59 6C/Ss	1-382
2	Sc59 E12 C/B	134-966
3	Sc59 poly	1-966
4	Sc59 NNRd	364-1618
5	Sc11 NS4	1590-2050
6	Sc11 NS5a	2006-2397
7	Sc11 NS5b	2396-3011



radioactif RPMI 1640 + 20% FBS. Les cellules cibles sont ensuite resuspendues afin d'avoir 3000 cellules par 100 µl. Cent µl seront distribués dans chacun des puits d'une plaque à 96 puits, correspondant à chaque cible. Les plaques sont ensuite centrifugées à 300 rpm pendant 3 min sans frein, et placées à 37°C pendant 5 h. La plaque contrôle, contenant chaque cible en quadruplicata, sera divisée en deux. La première moitié contiendra 100 µl de cellules cibles et 100 µl de RPMI 1640 + 20% FBS ; ceci constituera la lyse spontanée. La 2<sup>ème</sup> partie comprendra 100 µl de cellules cibles et 100 µl de triton X100 10% (Sigma, St-Louis, MO) ; ceci constituera la lyse totale. Après l'incubation de 5 heures, les plaques sont centrifugées 3 min à 300 rpm sans frein, et 100 µl de surnageant sont comptés à l'aide d'un compteur gamma. La formule de calcul pour la cytotoxicité est :  $(\text{compte de l'échantillon} - \text{compte de lyse spontanée}) \times 100\% / (\text{compte de lyse totale} - \text{compte de lyse spontanée})$ .

### **Transfections et co-transfection de CYP2D6**

Nous avons par la suite utilisé diverses méthodes afin de transfecter CYP2D6 dans les cellules B autologues pour que celles-ci puissent exprimer la protéine. Cela nous permettra d'utiliser ces cellules lors des tests de cytotoxicité.

*L'électroporation* a été effectuée à l'aide de l'électroporateur (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA) et réalisée selon le protocole du fabricant. Les cellules sont préalablement lavées dans 10 ml de tampon phosphate salin - PBS 1X (Gibco Invitrogen, Burlington, Ontario) et resuspendues dans 1 ml de PBS 1X. La quantité d'ADN voulue est ajoutée dans une cuvette allant dans l'électroporateur, puis l'électroporation a lieu avec les paramètres suivants : 250 mV, 12 ms, 960 µF. Après une minute de repos, les cellules sont mises dans 10 ml de RPMI 1640 10% FBS et centrifugées à 1300 x g (10 min). Elles sont ensuite resuspendues dans 10 ml de RPMI 1640 + 10% FBS et mises en culture à 37°C. Après 24 heures, l'antibiotique (G418) est ajouté à



une concentration de 1 µg/mL afin d'inhiber la croissance des cellules T et NK.

*La transfection* par lipovec a été effectuée selon le protocole du fabricant (Invivogen, San Diego, CA) : 800,000 cellules sont utilisées pour chaque transfection avec 100 µl de complexe LipoVec/ADN. Dans un microtube stérile de 1.7 ml, 1-5 µg de plasmide est ajouté pour chaque 100 µl de LipoVec (Lvec-1, Invivogen) et le tout est laissé 30 min à T° ambiante. Pendant ce temps, sur une plaque de 6 puits, 800,000 cellules à transfecter sont aliquotées dans chaque puits. Après 30 min, le complexe LipoVec/ADN est ajouté selon les quantités voulues et la plaque est mise à 37°C + 5% CO<sub>2</sub>. Après 3 jours, les cellules sont soit testées pour l'expression de la protéine désirée ou un antibiotique, la généticine (G418, Gibco Invitrogen, Burlington, Ontario) est ajouté au milieu pour la sélection des transfectants positifs. Dans ce dernier cas, la moitié du milieu est changé tous les 2-3 jours, en ajoutant de nouveau l'antibiotique à chaque fois.

### ***Détection de l'expression de CYP2D6***

Nous avons, par diverses techniques, testé l'expression de la protéine CYP2D6 transfectée dans les cellules B autologues.

### **Immunofluorescence**

Les cellules à analyser sont fixées sur des lames de microscope à l'aide d'un Cytospin 3 (Shandon, Pittsburgh, PA). Les lames sont ensuite lavées avec 500 µl de PBS 1X, fixées par le méthanol à -20°C/10 min et lavées de nouveau 3 fois. Les cellules sont perméabilisées dans du triton 0,2% (Sigma, St-Louis, MO) 10 min à température pièce (TP) et lavées 3 fois. Elles sont bloquées 30 min avec une solution de PBS 1X et BSA 3% (Sigma, St-Louis, MO) et incubées 2 heures avec le premier anticorps dilué dans du PBS 1X et BSA 1% en chambre humide, lavées 3 fois et incubées avec le 2<sup>ème</sup> anticorps.

Après 3 lavages en PBS 1X/BSA 3%, elles sont lavées 3 fois comme avant et la lamelle est ajoutée sur la lame.

### **Immunobuvardages**

Le gel de SDS polyacrylamide (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) utilisé est de 10% avec 10% persulfate d'ammonium (APS) (Sigma, St-Louis, MO) et 10% TEMED (Sigma) comme décrit par le fabricant. Une fois le gel polymérisé, les échantillons sont bouillis 5 min et centrifugés. Les échantillons sont ensuite chargés sur le gel. La migration (75V, 400mA) est arrêtée lorsque le bleu sort du gel (environ 3 à 3h30 de migration). Le gel est ensuite placé sur un montage de transfert semi-sec sur nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Lorsque le transfert est terminé, la membrane est plongée dans du rouge de ponceau (Sigma, St-Louis, MO) pendant 2 min, rincée à l'eau puis séchée. Une fois les inscriptions marquées et la ligne de front tracée, le marqueur (High Range, Sigma) est découpé et mis de côté. Les restes de la membrane sont incubés 2 h dans une solution de TBST 1X + lait (poudre de lait) 5%, puis un autre 2 h avec le premier anticorps dans du TBST 1X + lait 1%. La membrane est rincée 3 fois (5/5/15 min) dans du TBST 1X et incubée par la suite avec le second anticorps couplé à la peroxydase pour 1 h. La membrane est ensuite plongée 1 min dans 10 ml de substrat et 100 µl de réactif (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche, Laval, Québec) puis apposée sur un film (Biomax Film, Kodak). Celui-ci est ensuite révélé en chambre noire. Les temps d'expositions dépendent de l'expérience (peuvent varier de 20 sec à 16 heures).

### **Traduction *in vitro* de la protéine CYP2D6**

N'ayant pu détecter la protéine CYP2D6 par ces méthodes, nous avons, pour confirmer l'expression de la protéine, utilisé la traduction *in vitro*. Pour la traduction *in vitro*, le protocole TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI) a été utilisé ; celui-ci utilise de la méthionine marquée

radioactivement ( $^{35}\text{S}$ ). L'ADN est ajouté aux réticulocytes de lapin et à la polymérase. Une fois la réaction complétée, une partie est mise sur gel de SDS-PAGE qui est ensuite fixé et séché, puis exposé sur un film.

## **Radio-immunoprécipitation**

### *Marquage et lyse de cellules en suspension*

Le marquage a été effectué selon le protocole publié<sup>157</sup>. Cent milles cellules sont lavées 2 fois dans un milieu de marquage<sup>158</sup> et resuspendues dans 1 ml du même milieu, puis incubées par la suite pendant 15 min à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 300 x g et débarrassées du surnageant. Elles sont resuspendues dans 500 µl d'une solution de méthionine radiomarkée au  $^{35}\text{S}$  (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) à 0.2 mCi/ml et incubées 1 h à 37°C. Les cellules sont lavées 5 min à 300 x g et resuspendues dans du PBS. L'incorporation de méthionine radioactive est ensuite déterminée par précipitation au TCA. 10 µl à 50 µl de cellules marquées sont ajoutées à 500 µl d'une solution de BSA 0.1 mg/ml contenant 0.02% de  $\text{NaN}_3$ . On y ajoute ensuite 500 µl de solution TCA 20%, sur glace. Elles sont incubées 30 min sur glace et filtrées sous vide sur des petits filters en disque qui sont lavés 2 fois avec 5 ml de TCA 10% et 100% d'éthanol, puis séchés. L'incorporation est ensuite mesurée au moyen d'un compteur à scintillation. Le restant des cellules est lysé pour l'immunoprécipitation. Pour ce faire, les cellules sont incubées 1 h dans un tampon de lyse (1% triton, 1% albumine, 1 mM iodoacétamide), le tout dans une solution de saline (Tris/saline/sodium azide – TSA) à 4°C puis centrifugées pendant 10 min à 3000 x g. Le surnageant est gardé et le culot jeté.

### *Immunoprécipitation*

Dix µl de protéines marquées – environ 50,000 cpm - (provenant soit 1- de la protéine obtenu auparavant à l'aide du kit TnT coupled reticulocyte lysate system ou 2- du marquage et de la lyse de cellules) sont ajoutées à 50 µl de sérum pré immun (afin de diminuer le bruit de fond) et 2 mg de billes de

sépharose couplées à la protéine A (Sigma, St-Louis, MO). Elles sont ensuite incubées 30 min à 4°C et centrifugées 12,000 x g pendant 10 sec. Le surnageant est ajouté à 500 µl de tampon NET (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA et 0.02% azide de sodium) et 5 µl d'anticorps monoclonal anti-CYP2D6 (Gentest, Woburn, MA, ne fonctionne qu'en immunoprécipitation). Il est par la suite incubé 2 h à 4°C avant d'ajouter 8 µl de protéine A (0.25 g/ml), d'incuber 1 h à 4°C et de centrifuger 10 sec (12,000 x g) à 4°C. Effectuer ensuite ce qui suit 6 fois : ajouter un volume de tampon RIPA (0.1% SDS dans tampon de lyse), resuspendre, incuber 20 min à 4°C et centrifuger 10 sec (12,000 x g) à 4°C. Le culot final est resuspendu dans 10 µl de tampon de chargement, bouilli 5 min et migré sur un gel de SDS polyacrylamide à 10%. Le gel est séché et ensuite exposé sur un film.

### **Tri et concentration des cellules transfectées**

Comme dernières expériences, nous avons utilisé la cytométrie en flux afin d'analyser le taux d'expression de la protéine CYP2D6 dans les cellules B autologues.

#### *Cytométrie en flux*

Quatre jours suivant la transfection de la green fluorescent protein (GFP) dans les cellules, effectuée par le FACSCalibur de Beckton Dickinson (Oakville, Ontario), celles-ci ont été analysées selon la présence ou non du plasmide contenant la GFP. Le canal de fluorescence FL1 a été utilisé et les critères d'analyses ont été basés sur la grosseur (FSC) et la granulosité (SSC) des cellules.

#### *Tri cellulaire*

Les cellules ont ensuite été triées par l'appareil de FACS Vantage (Beckton-Dickinson, Oakville, Ontario) en fonction de l'incorporation d'un plasmide contenant la GFP. Le canal de fluorescence FL1 a été utilisé, et les cellules ont aussi été analysées en fonction de leur FSC et SSC. Trois x 10<sup>6</sup> de

chaque condition ont été lavées 2 fois dans une solution de PBS 1X puis resuspendues à  $1 \times 10^6$  cellules / ml dans des tubes de 5 ml à fond rond (Falcon, Oakville, Ontario). Le contrôle négatif contenait  $1 \times 10^6$  cellules non-transfectées. Les cellules ont été récupérées dans 500  $\mu$ l de milieu RPMI 1640 + 20% FBS. Après triage, elles ont été centrifugées 9 min à  $1500 \times g$ , puis resuspendues dans 5 ml de milieu RPMI 1640 + 20% FBS. Le lendemain, 80  $\mu$ l de G418 (50 mg/ml) ont été ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 800  $\mu$ g/ml d'antibiotique.

## Résultats et discussion

Ce projet vise à étudier la cytolyse autologue et le mimétisme immunitaire dans le contexte de l'autoimmunité hépatique induite par le VHC afin de démontrer le mimétisme. Le schéma général du projet est illustré à la figure 8 : dans un premier temps, nous allons cloner les cellules CD8<sup>+</sup> du patient afin d'obtenir des micropopulations de cellules T que nous allons tester contre des antigènes du virus de l'hépatite C lors de tests de cytotoxicité. Les micropopulations positives, c'est-à-dire celles qui lysent les cellules cibles exprimant des peptides du VHC, seront testées sur des cibles exprimant CYP2D6 afin de vérifier l'hypothèse du mimétisme immunitaire. Pour ce test, nous allons utiliser des cellules B autologues transformées dans lesquelles nous insérerons le gène de CYP2D6 afin qu'il soit exprimé dans la cellule et que les peptides qui en sont dérivés soient présentés à sa surface. Si nous trouvons des micropopulations positives communes aux deux tests, nous aurons une preuve du mimétisme immunitaire existant entre le VHC et le CYP2D6. Nous espérons pouvoir, par la suite, tester ces micropopulations sur des hépatocytes autologues afin d'utiliser les même cibles présentes dans l'organisme.

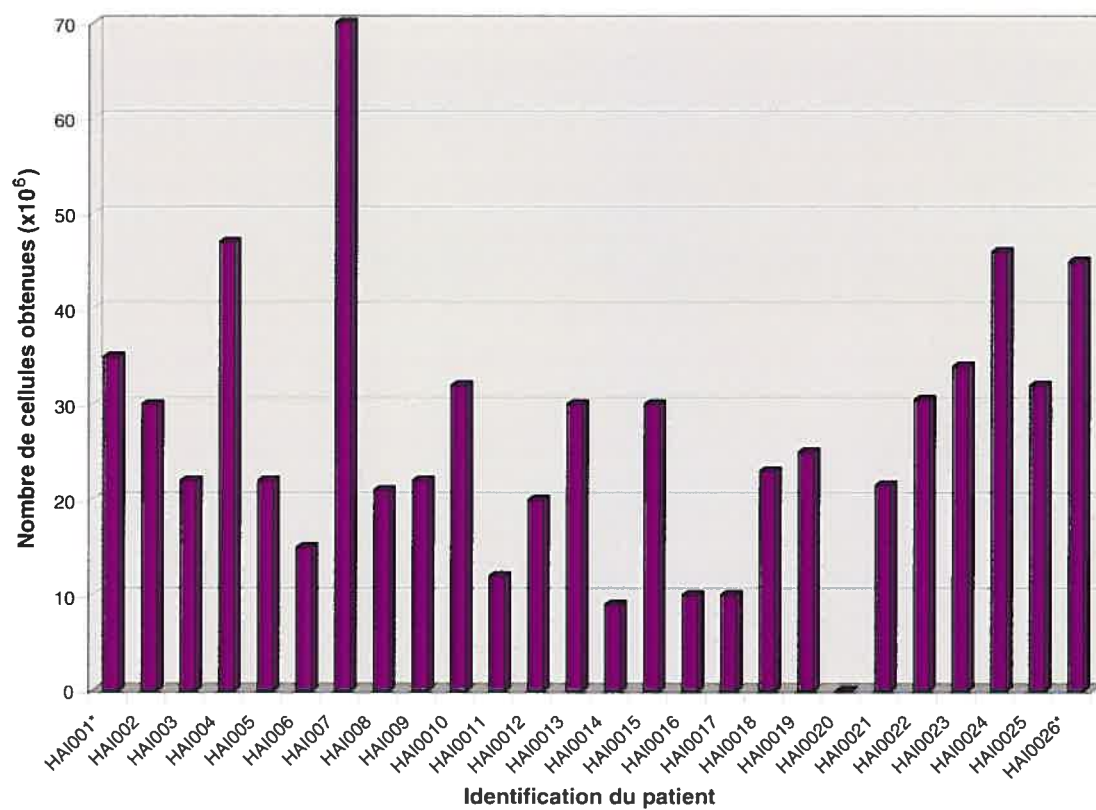
### *Isolation des lymphocytes T*

Les quantités de cellules obtenues pour tous les gradients de Ficoll effectués sont résumées dans la figure 10. Les gradients de Ficoll ont été effectués pour la majorité des échantillons dès leur réception ; certains ont passé la nuit à température ambiante avant d'être traités. Le Ficoll effectué sur le patient HAI020 a échoué à cause de la formation d'un caillot dans le tube et aucune cellule n'a pu être récupérée.

La quantité de cellules attendues pour chacun des gradients de Ficoll était d'environ  $1 \times 10^6$  cellules par ml de sang total. Environ 46% des extractions ont donné énormément de cellules et 15% n'en ont donné que très peu.

**Figure 10 : Résumé des rendements obtenus par gradient de Ficoll pour chaque patient.** Les gradients ont été fait à partir de 20 ml de sang prélevé dilué 1:1 dans du RPMI 1640 10% FBS. La centrifugation a été effectuée à 1500 rpm pendant 30 minutes (sans freins) suivi de deux lavages en milieu de culture. Les cellules ont été congelées immédiatement à -80°C dans un milieu composé de 90% de sérum fœtal de veau et 10% de DMSO.

\* Patient LKM1<sup>+</sup>





Nous avons concentré notre travail sur le patient HAI001 LKM1<sup>+</sup>. Tous les autres patients, à l'exception du dernier, aussi LKM1<sup>+</sup> (obtenu à la fin de l'étude seulement), dont nous avons reçu le sang récemment, devaient servir de contrôles négatifs à l'expérience. Nous avons donc 3 groupes principaux de patients, les deux derniers étant des contrôles :

- VHC<sup>+</sup> LKM1<sup>+</sup>
- VHC<sup>+</sup> LKM1<sup>-</sup> cirrhose<sup>-</sup>
- VHC<sup>+</sup> LKM1<sup>-</sup> cirrhose<sup>+</sup> (dont 3 transplantés)

Après avoir obtenu les lymphocytes du patient HAI001, nous avons procédé à leur transformation par le virus d'Epstein Barr (VEB) afin d'établir une souche de cellules sans arrêt de multiplication.

Nous avons en premier lieu procédé à quatre clonages de cellules T du patient HAI001. Ceci nous a permis d'obtenir une centaine de micropopulations pour chaque clonage afin de les utiliser pour les tests de cytotoxicité.

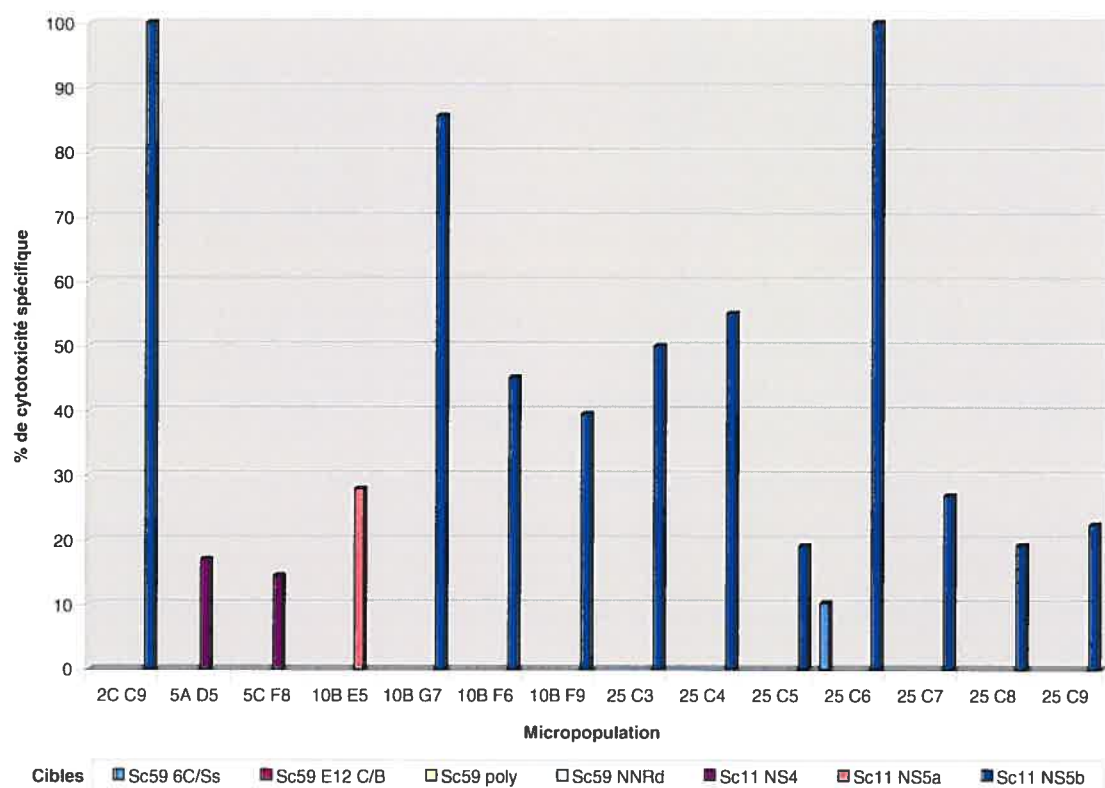
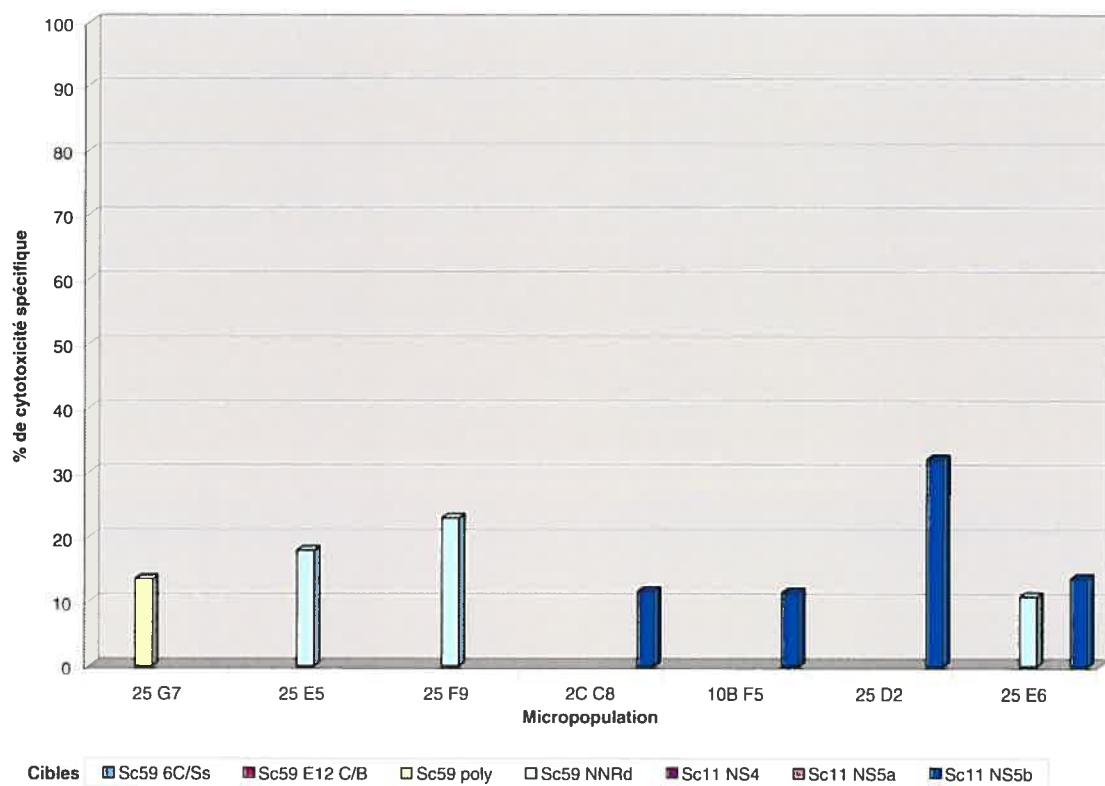
### ***Tests de cytotoxicité***

Les cellules B transformées venant du patient HAI001 ont été utilisées comme cibles autologues lors des tests de cytotoxicité. Sept groupes de  $5 \times 10^5$  cellules B ont chacun été infectés par un recombinant vaccinia différent, exprimant des fragments de la polyprotéine du VHC. Les quatre premiers tests de cytotoxicité comportaient 7 cibles, soit ces 7 fragments peptidiques (Figures 9 et 11). Une fois infectées, les cellules présenteront à leur surface des fragments des peptides VHC exprimés. Toutes les cibles ont été traitées de la même façon lors de l'expérience. Dans des expériences futures, il faudrait ajouter un contrôle négatif composé de cellules non-infectée immortalisées. Pour chaque test de cytotoxicité, entre 4 et 14 clones positifs ont été obtenus, clones qui ne reconnaissaient qu'un seul des sept peptides de la polyprotéine, ou deux qui se chevauchent. Les clones reconnaissants

**Figure 11 : Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1<sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #1 et #2.** Les cellules B transformées (cibles) sont infectées 16 heures avant le test par les 7 recombinaux vaccinia exprimant différentes portions de la polyprotéine du VHC (voir figure 6), pour être ensuite chargées de <sup>51</sup>chromate de sodium. Les cellules T CD8<sup>+</sup> (effecteurs) sont ajoutées aux cellules cibles et incubées 5 heures. Enfin, la quantité de radiotracer relâché au surnageant est mesurée au moyen d'un compteur gamma.

Formule pour le calcul de la cytotoxicité spécifique :

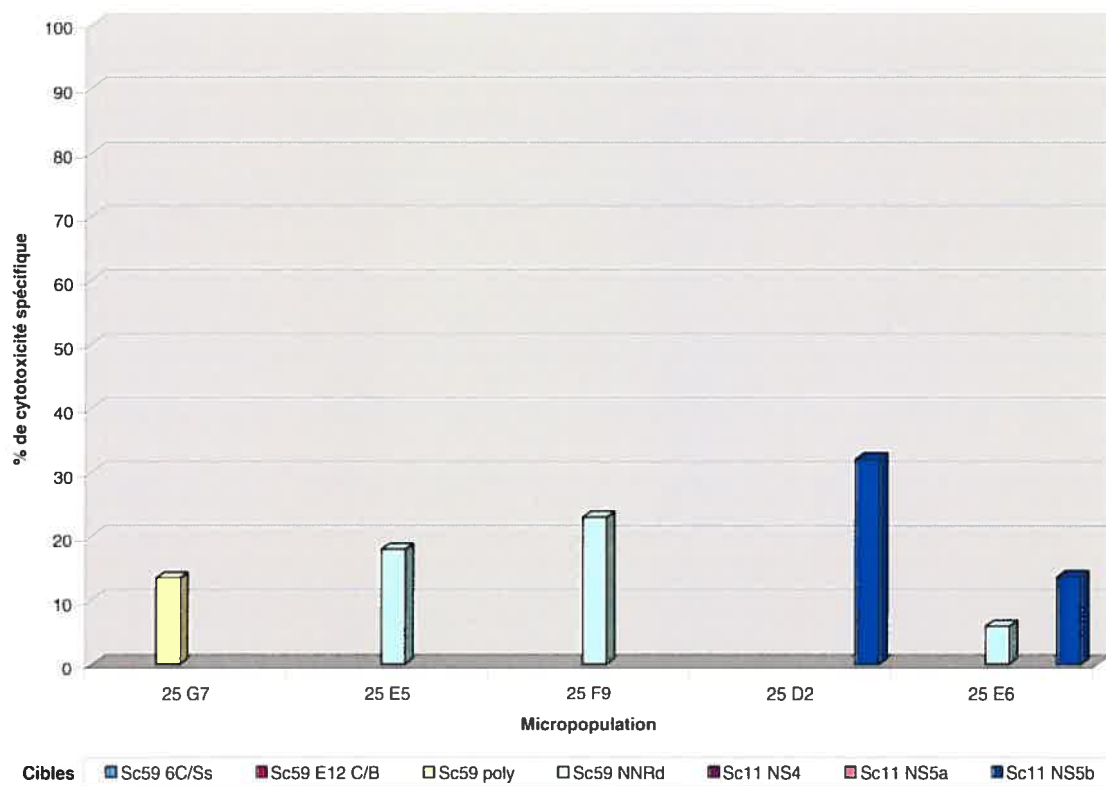
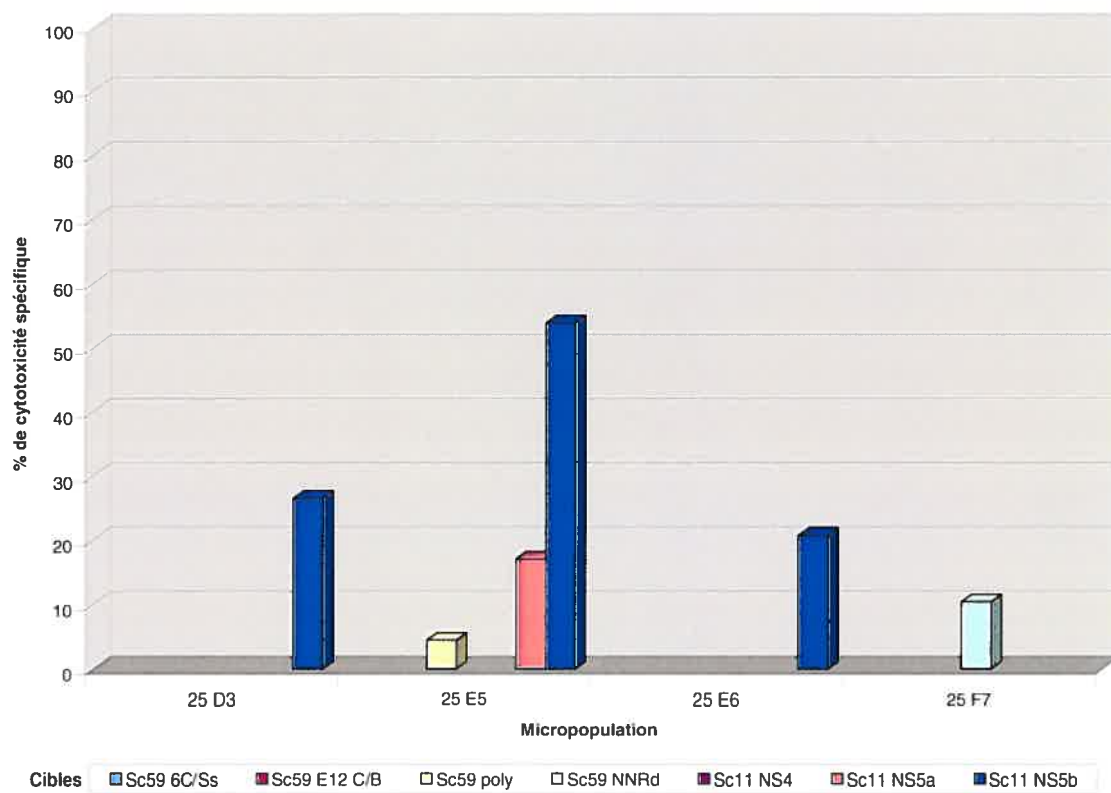
$$\frac{(\text{compte de l'échantillon} - \text{compte de lyse spontanée}) \times 100\%}{(\text{compte de lyse totale} - \text{compte de lyse spontanée})}$$



**Figure 11 (suite) : Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1<sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #3 et #4.** Les cellules B transformées (cibles) sont infectées 16 heures avant le test par les 7 recombinants vaccinia exprimant différentes portions de la polyprotéine du VHC (voir figure 6), pour être ensuite chargées de <sup>51</sup>chromate de sodium. Les cellules T CD8<sup>+</sup> (effecteurs) sont ajoutées aux cellules cibles et incubées 5 heures. Enfin, la quantité de radiotracer relâché au surnageant est mesuré au moyen d'un compteur gamma.

Formule pour le calcul de la cytotoxicité spécifique :

$$\frac{(\text{compte de l'échantillon} - \text{compte de lyse spontanée}) \times 100\%}{(\text{compte de lyse totale} - \text{compte de lyse spontanée})}$$

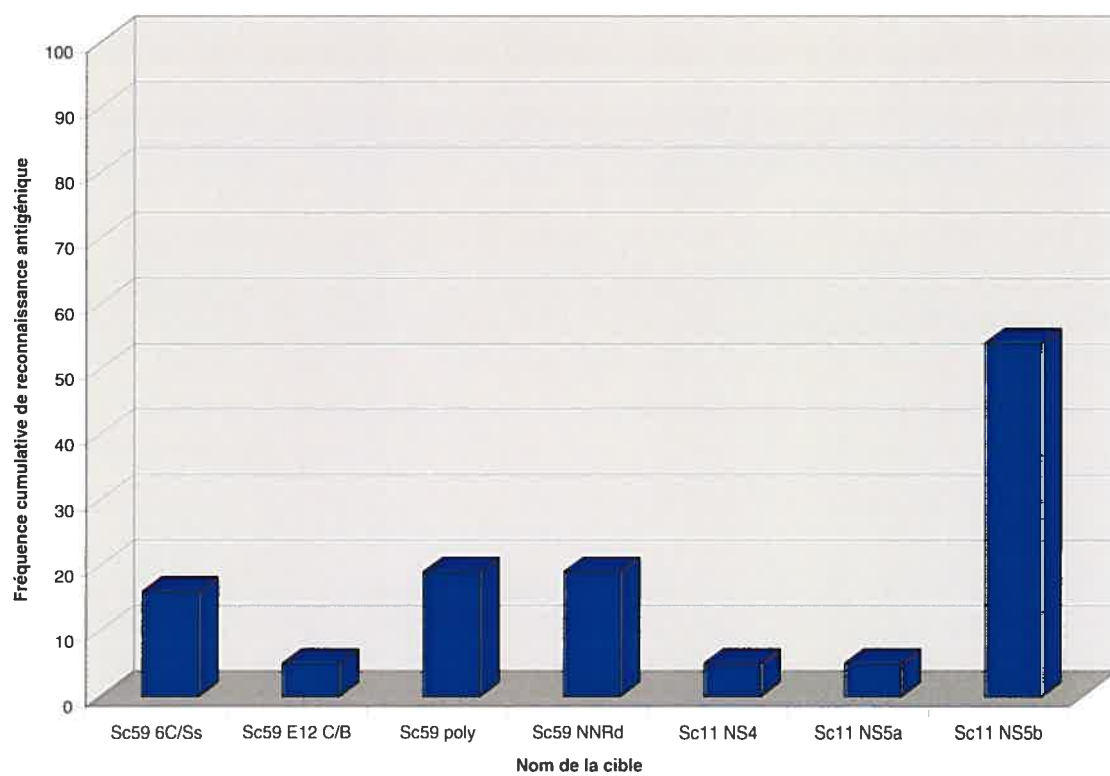


des cibles non superposées et ceux reconnaissant toutes les cibles ont été rejetés, puisqu'il s'agit très probablement de cellules NK ou de cellules activées contre le VEB. La moyenne de cytotoxicité spécifique des clones du test #1 est de  $20\% \pm 10$ , le test #2 de  $30\% \pm 10$ , le test #3 de  $20\% \pm 5$  et le test #4 de  $15\% \pm 5$ .

La majorité des clones positifs obtenus pour tous les tests ne reconnaissent qu'une seule cible. La cible #7, soit SC11 NS5b, est la cible la plus souvent reconnue parmi les micropopulations des quatre premiers tests de cytotoxicité, avec 54% de reconnaissance. Elle est aussi la cible ayant eu le plus haut taux de cytotoxicité en général, soit de 100%. La figure 12 montre les pourcentages obtenus pour chaque cible. Une hypothèse pour expliquer la fréquence de reconnaissance de la région NS5b est que les peptides utilisés dans le test proviennent du VHC type 1a alors que le patient est infecté par un VHC de type 1b. Comme les séquences des épitopes reconnus pour le type 1b sont différentes du 1a, il est normal de voir une réactivité plus faible pour tous les épitopes normalement variables. Les régions les plus conservées entre ces deux types, qui comprennent la région NS5b (très peu variable<sup>159</sup> afin d'assurer une réplication du virus), sont quant à elles très semblables et donc plus reconnues.

Les tests de cytotoxicité nous ont donc permis de trouver plusieurs micropopulations réactives contre le VHC. Elles pourront être testées par la suite contre CYP2D6 afin de vérifier l'hypothèse du mimétisme immunitaire. Pour ce faire, nous devons construire un vecteur exprimant CYP2D6 afin de l'incorporer dans nos cellules cibles pour le test de cytotoxicité.

**Figure 12 : Fréquence cumulative de la reconnaissance antigénique pour chaque cible lors des tests de cytotoxicité effectués sur le patient HAI001.** Les cellules B transformées (cibles) sont infectées 16 heures avant le test par les 7 recombinaux vaccinia exprimant différentes portions de la polyprotéine du VHC (voir figure 6), pour être ensuite chargées de  $^{51}$ chromate de sodium. Les cellules T CD8<sup>+</sup> (effecteurs) sont ajoutées aux cellules cibles et incubées 5 heures. Enfin, la quantité de radiotraceur relâché au surnageant est enfin mesuré au moyen d'un compteur gamma. Les pourcentages de chaque cible pour les 4 tests ont été additionnés. Le graphique représente un total de 35 clones testés.



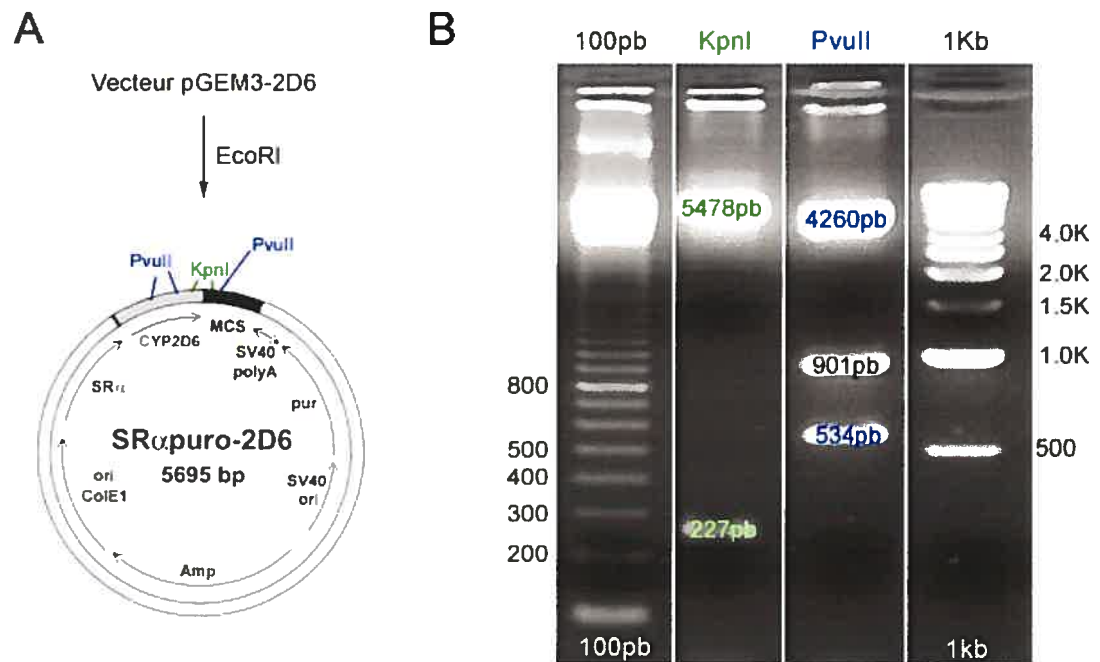


### ***Assemblage du vecteur pSR $\alpha$ -2D6***

CYP2D6 a été transféré du vecteur pGEM3-2D6 (obtenu du laboratoire du Dr Fernando Alvarez, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Canada) au nouveau vecteur pSR $\alpha$ -puro (obtenu du Dr Francois Denis, Institut Armand Frappier, Laval, Canada). Le vecteur pSR $\alpha$ -puro servira à la production de la protéine CYP2D6 dans les cellules eucaryotes. L'insertion des sites de restriction Eco RI a été ensuite vérifiée à l'aide des enzymes de restriction Kpn I et Pvu II. Deux sites de restriction Kpn I étaient présents, un dans le vecteur et l'autre dans CYP2D6, donnant comme attendu deux fragments, un de 5478 pb et un de 227 pb. Quant à Pvu II, il était présent trois fois, soit deux fois dans CYP2D6 et une fois sur le vecteur. Les fragments attendus et obtenus étaient de 4260 pb, 901 pb et 534 pb (Figure 13).

### ***Électroporation de pSR $\alpha$ -2D6 dans les cellules B transformées***

Les échantillons de cellules ( $10 \times 10^6$  cellules) ont subi l'électroporation et ont été mis sous sélection antibiotique (puromycine) pendant un mois. Une deuxième tentative a été effectuée avec diverses quantités d'ADN et d'antibiotique. Les quantités d'ADN, soit CYP2D6, testées étaient de 10, 15 et 20  $\mu$ g. Les concentrations de puromycine testées étaient de 0, 0.1, 0.5, 1 et 2  $\mu$ g/ml pour chacune des quantités d'ADN. Après 5 semaines, les cellules ont été congelées pour des tests ultérieurs. La mortalité des cellules restantes est peut-être due au fait que le gène de résistance à la puromycine présent dans le vecteur n'a pas pénétré dans les cellules. Donc, malgré les concentrations assez faibles d'antibiotique, elles n'ont pu survivre. Il est aussi envisageable que le promoteur du vecteur pSR $\alpha$ -puro ne soit pas fonctionnel ou efficace et mènerait donc à une sous-production ou une absence d'expression de la protéine du gène de résistance à la puromycine. De plus, la méthode endommage énormément la majorité des cellules et n'en laisse que très peu intacte.



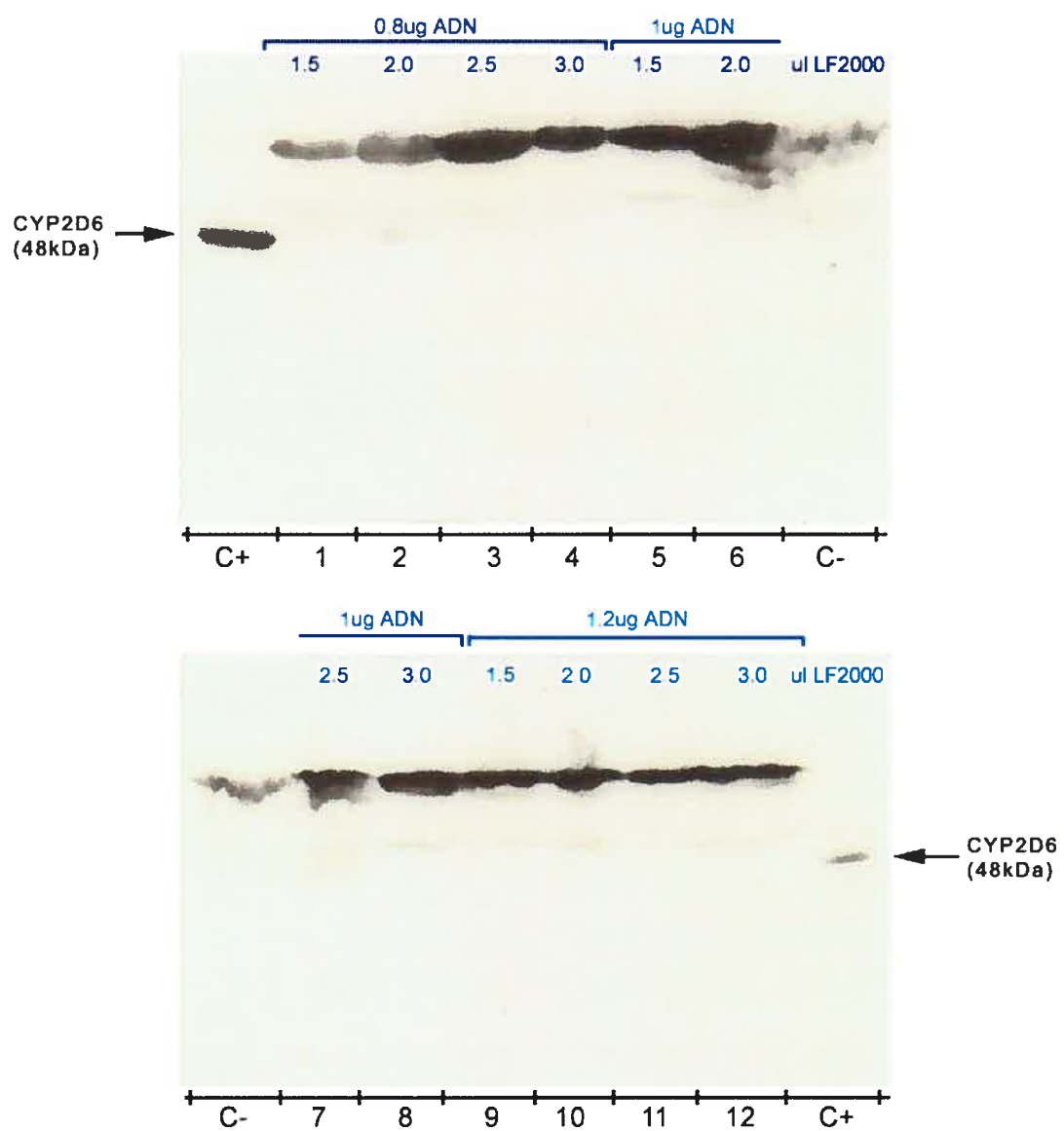
**Figure 13 : Assemblage du vecteur pSR $\alpha$ -puro-2D6 à partir du vecteur pGEM3-2D6.** A, représentation du vecteur et de l'insert ainsi que les sites de restriction utilisés pour le clonage. B, digestion par enzyme de restriction pour la vérification du clonage : rangée 1, digestion par Kpn I; rangées 2 et 3, marqueurs de 100 pb et 1 Kb respectivement; rangée 4, digestion par Pvu II. Gel d'agarose de 1.5 % avec une migration de 1 heure à 120 volts.

Celles-ci ne seraient pas capables de proliférer étant trop diluées. Cette méthode a été jugée trop radicale et inefficace dans notre cas. Nous avons donc opté pour une transfection à l'aide de produits tels que la Lipofectamine 2000 (LF2000) de Invitrogen et le LipoVec/LipoGen de Invivogen. La première transfection a été effectuée avec la LF2000 et la production de CYP2D6 a été analysée par immunobuvardage.

### ***Immunobuvardage***

L'expression de CYP2D6 après transfection par LF2000 a été évaluée par immunobuvardage. Douze conditions de transfection (3 séries [0.8, 1, 1.2 µg ADN] de 4 puits [1.5, 2, 2.5, 3 µl LF2000]) ont été testées avec un sérum de patient LKM1<sup>+</sup>. Le contrôle positif est constitué de microsomes de foie (obtenu du laboratoire du Dr Alvarez, Hôpital Ste-Justine) contenant la protéine CYP2D6 et des cellules B non transfectées servant de contrôle négatif. Aucun des échantillons ne s'est révélé être positif pour CYP2D6 (Figure 14). Nous avons seulement obtenu des bandes non spécifiques identiques pour chaque échantillon et le contrôle négatif. Une surexposition prolongée du film a confirmé l'absence de bande à 48kDa, poids moléculaire attendu de CYP2D6. La manipulation n'est pas en cause ici puisque les contrôles positifs ont très bien fonctionné. En absence de contrôle positif disponible sur le moment pour la transfection même, nous n'avons pu tester si elle avait bien fonctionné ou non. Pour les expériences futures, il serait possible de co-transfecter un plasmide contenant la protéine de fluorescence verte (GFP) qui servira à passer les cellules en cytométrie en flux. Nous pourrions ainsi avoir une approximation de la quantité de cellules transfectées. Outre la transfection même, le vecteur pourrait ne pas avoir un promoteur assez fort pour exprimer correctement la protéine. En plus, lors d'un séquençage de la partie N-terminale de CYP2D6 provenant de pGEM3-2D6, nous avons constaté qu'il manquait le codon ATG (5'-GGG CTA...-3' au lieu de 5'-ATG GGG CTA...-3'). Il nous a donc fallu le corriger (figure 18).

**Figure 14 : Détection de CYP2D6 par immunobuvardage des 12 échantillons des transfections effectuées sur des cellules B à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et de l'ADN de CYP2D6. C<sup>+</sup>, contrôle positif, fraction microsomale de foie ; colonnes #1 à 12, échantillons ; C<sup>-</sup>, contrôle négatif (cellules non transfectées).**

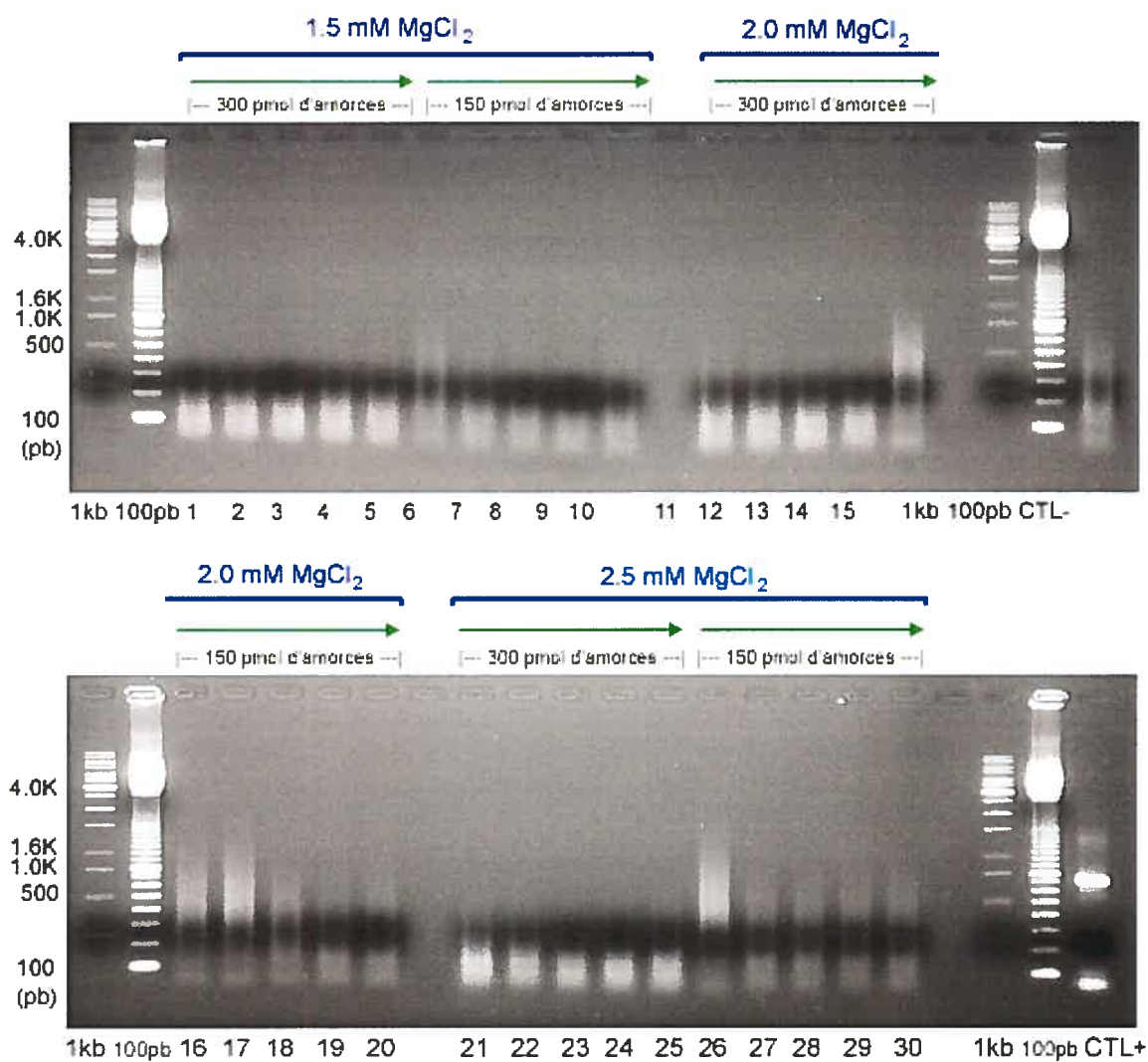


### ***Correction de l'ATG de CYP2D6 par PCR***

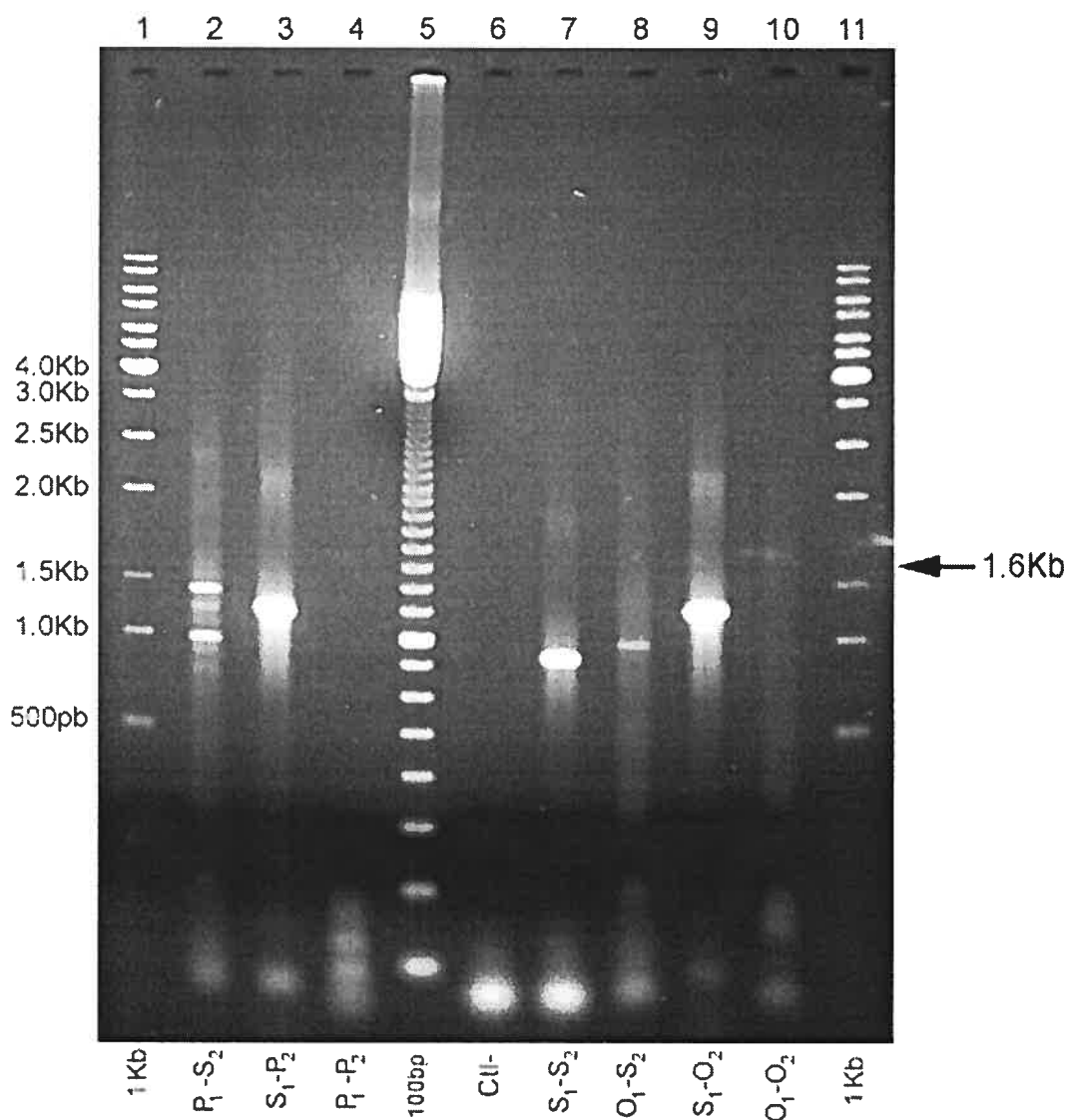
Nous avons donc procédé à une PCR afin de reconstruire l'ATG manquant. La PCR de la figure 15 a comme but d'établir les conditions de températures et de concentrations de  $MgCl_2$  optimales. La matrice utilisée est l'ADN de CYP2D6 seul extrait du vecteur. Aucune bande visible n'a été obtenue pour toutes les conditions, variant de 1.5 mM à 2.5 mM de  $MgCl_2$  et de 57.0°C à 59.0°C. Nous avons pu tester plusieurs autres températures entre 50°C et 60°C avec d'autres PCR. Elles ont toutes donné les mêmes résultats. Les seules bandes visibles au front de migration sont les amorces utilisées pour la PCR. Tous les échantillons étaient semblables au contrôle négatif. Le contrôle positif (constitué des amorces  $S_1$  et  $S_2$  décrites ci bas) quant à lui a très bien fonctionné (la bande du bas étant les amorces) ; la manipulation n'est donc pas en cause.

À l'aide d'amorces fonctionnelles ( $S_1$  et  $S_2$ ) provenant du laboratoire du Dr Alvarez, nous avons pu procéder à divers tests afin de trouver la raison pour laquelle aucun produit de PCR n'est obtenu. Ces amorces sont utilisées pour amplifier la région C-terminale débutant à 672 pb pour se terminer à 1377 pb sur CYP2D6, qui contient les principaux sites antigéniques. Le produit de PCR obtenu avec ces amorces est donc aussi de 705 pb. Nous avons utilisé nos deux jeux d'amorces ( $P_1$ ,  $P_2$  et  $O_1$ ,  $O_2$ ) ainsi que  $S_1$  et  $S_2$  pour créer divers appariements. Nous avons réussi à obtenir une ou plusieurs bandes intenses (telles qu'attendues) de produits lorsque nous utilisons seulement les amorces S ( $S_1/S_2$ ) ou un mélange d'une amorce S et une amorce P ou O ( $S_1/P_2$ ,  $S_1/O_2$ ,  $P_1/S_2$  et  $O_1/S_2$ ). Néanmoins, lorsque nous utilisons les amorces  $P_1/P_2$ ,  $O_1/O_2$  (ainsi que  $P_1/O_2$  ou  $O_1/P_2$  : résultats non montrés) nous n'obtenons aucun produit de PCR (Figure 16). Nous avons tenté de changer la température, dans certains cas jusqu'à 50°C afin de d'analyser toutes les bandes possibles et ce, même non spécifiques. Nous pouvons tout de suite éliminer les possibilités d'une enzyme déficiente ou d'un dNTP manquant,

**Figure 15 : Réactions de PCR pour déterminer les conditions en  $MgCl_2$  et la température optimale (effectuées sur CYP2D6 seulement).** Rangées 1, 20, 23 et 42, marqueur 1 Kb; rangées 2, 21, 24 et 43, marqueur 100 pb; rangées 3 à 12,  $MgCl_2$  1.5 mM; rangées 14-18 et 25-29,  $MgCl_2$  2.0 mM; rangées 30 à 40,  $MgCl_2$  2.5 mM; rangée 22; contrôle négatif sans ADN; rangée 44, contrôle positif avec amorces déjà testées sur CYP2D6 (fragment d'environ 800pb seulement). Chaque série de 10 rangées était composée de 2 fois 5 échantillons : rangées 1-5 : 300 picomoles d'amorces, rangées 6-10 : 150 picomoles. Pour chaque 5 rangées, le gradient de températures étaient : 57.0, 57.4, 58.1, 58.6 et 59.0°C pendant 1 min. Le gel d'agarose est de 1 % et migré pendant 2 heures à 120 volts.





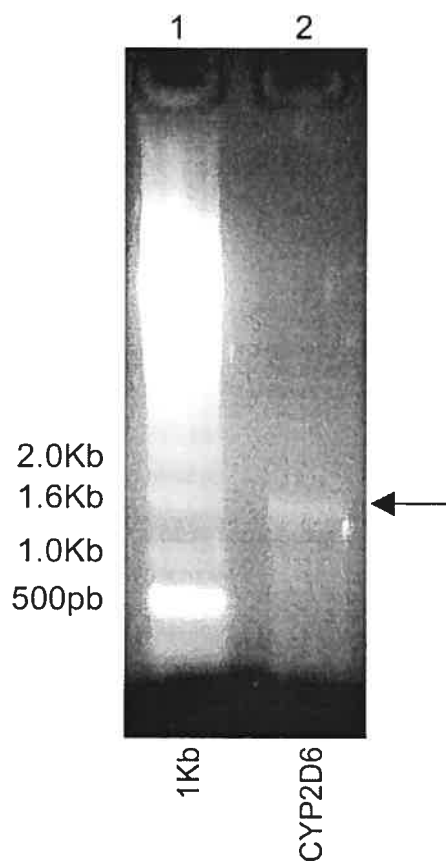


**Figure 16 : Test de validité par PCR, des deux paires d'amorces (amorces P et O) servant à corriger l'ATG manquant ; effectué sur CYP2D6 seul.** Rangées 1 et 11, marqueur 1 Kb; rangées 5, marqueur 100 pb; rangées 6, contrôle négatif (sans ADN); rangées 2-4, divers appariements des amorces P et S; rangées 8-10, divers appariements des amorces O et S; rangée 7, contrôle positif avec amorces S déjà testées sur CYP2D6 (fragment d'environ 800 pb). Le gel d'agarose de 1 % est migré pendant 2 heures à 120 volts.

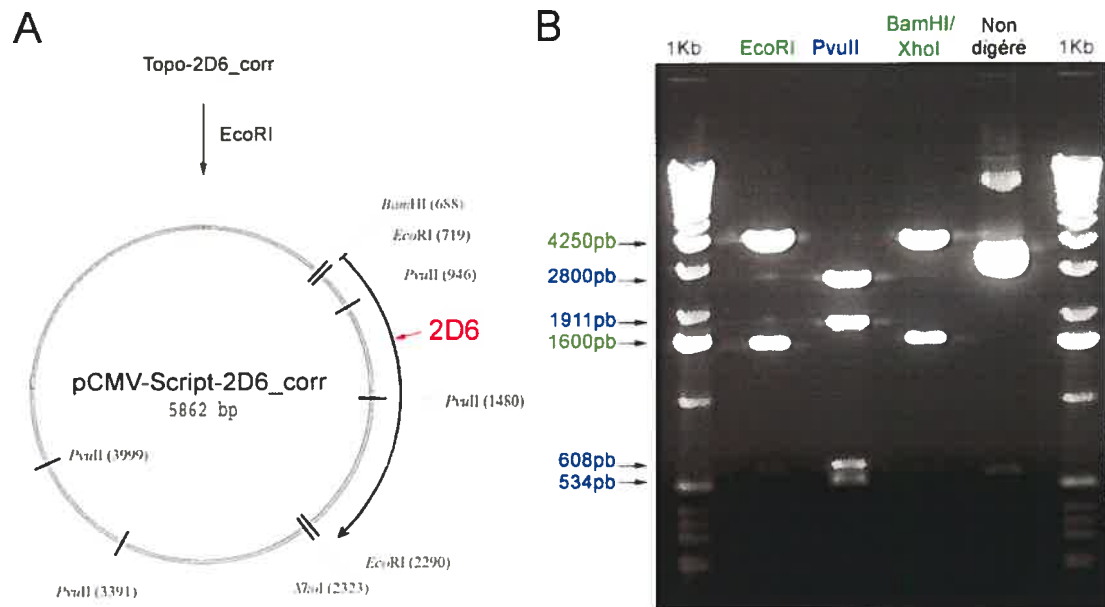
puisque toutes les autres réactions ont fonctionné. Nous avons aussi tenté une « nested PCR », soit une PCR effectuée sur les produits de la première PCR en utilisant des amorces situées à l'intérieur des amorces de la première réaction. Encore une fois, nous ne pouvons déceler aucune bande. Nous avons conclu que la quantité de matrice de départ était probablement insuffisante par rapport à nos amorces (qui couvrent CYP2D6 en entier). Nous avons quintuplé sa quantité. La PCR effectuée dans ces conditions nous a finalement permis d'obtenir ce produit à 1,6 Kb (Figure 17). La bande sur le gel préliminaire (non découpée par la suite) est très faible, mais n'est que le 1/50 de la réaction de PCR totale de 100 µl. La bande découpée servant à isoler l'ADN était beaucoup plus intense. Nous avons cloné le produit obtenu dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen).

### ***Assemblage du vecteur pCMV-Script-2D6***

Nous n'arrivions pas à obtenir une lignée cellulaire résistante à la sélection par la puromycine. Nous avons donc transféré l'ADNc du CYP2D6 dans le pCMV-Script à partir du vecteur Topo-2D6 (figure 17), utilisé pour corriger l'ATG manquant de CYP2D6. Le transfert a eu lieu à l'aide de l'enzyme de restriction Eco RI, et la vérification à l'aide des enzymes Eco RI, Pvu II et Bam HI/Xho I. Chaque profil obtenu correspondait aux fragments prévus. Pour les profils de Eco RI et Bam HI/Xho I, les 65 pb de différences ne se voient pas sur le présent gel d'agarose 1% (Figure 18). Le nouveau vecteur pCMV-Script-2D6 est donc complet. Nous avons ensuite séquencé toute la région comprenant CYP2D6 afin d'être certain qu'aucune mutation n'était présente et que l'ATG avait bel et bien été reconstitué (Figure 19).



**Figure 17 : Réactions de PCR utilisant cinq fois plus de matrice de départ (100 ng de CYP2D6), pour corriger l'ATG manquant. Rangées 1, marqueur 1 Kb; rangées 2, produit de PCR de CYP2D6. Le gel d'agarose de 1 % est migré pendant 1 heure à 120 volts. La bande obtenue sur cette figure pour CYP2D6 ne représente que le 1/50 du produit de PCR total obtenu (100  $\mu$ l). Les amorces O<sub>1</sub> et O<sub>2</sub> ont été utilisées.**



**Figure 18 : Assemblage du vecteur pCMV-Script-2D6 à partir du vecteur Topo-2D6\_corr.** Le vecteur Topo-2D6\_corr est celui dans lequel le produit de PCR corrigé (ATG ajouté) a été cloné. A, représentation du vecteur et de l'insert ainsi que les sites de restriction utilisés pour le clonage et la vérification. B, la carte de restriction pour la vérification du clonage : rangée 1 et 6, marqueur de 1 Kb; rangée 2, digestion par Eco RI; rangée 3, digestion par Pvu II; rangée 4, double digestion par Bam HI et Xho I; rangée 5, pCMV-Script-2D6 non digéré. Gel d'agarose de 1.5 % avec une migration de 2 heures à 120 volts.

**CYP2D6 incomplet de pGEM3-2D6 :**

5'-c...gggctagaagcactggtgcccctggccgtgatagtgccatcttcctgctcctggtgga... 3'

**CYP2D6 reconstitué dans pCMV-Script-2D6 :**

5'-tatgggctagaagcactggtgcccctggccgtgatagtgccatcttcctgctcctggtgga... 3'

**Figure 19 : Séquence de la partie N-terminale de CYP2D6 avant et après la correction par PCR de l'ATG manquant.** La reconstitution a été effectuée à l'aide d'une amorce qui contient en 5' les acides nucléiques ATG ainsi que le reste du début de la séquence de la partie N-terminale de CYP2D6 : 5'-ATGGGGCTAGAAGCACTGGTG-3'. L'amorce de la partie 3' a été construite selon les acides nucléiques présents sur la partie C-terminale de CYP2D6 : 5'-GGA ACTACCACATTGCTT-3'.

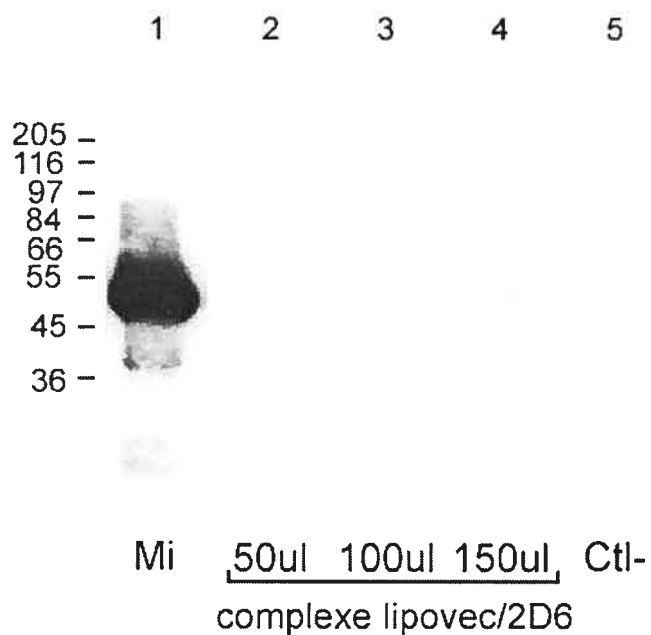
### ***Expression de CYP2D6 à partir du vecteur Topo-2D6***

Après un premier séquençage du CYP2D6 provenant du vecteur pGEM3, nous avons noté l'absence du premier ATG, ce qui nuisait considérablement à nos transfections. Nous avons donc reconstitué l'ATG par PCR et vérifié le produit de nouveau par séquençage dans le vecteur TOPO puis dans le vecteur pCMV-Script.

Nous avons refait l'expérience d'immunobuvardage, mais cette fois avec CYP2D6 corrigé dans le vecteur pCMV-Script-2D6. Nous avons aussi utilisé le complexe lipovec de Invivogen pour les transfections au lieu de la lipofectamine 2000 de Invitrogen. Trois conditions ont été testées où la quantité de complexes de lipovec/CYP2D6 a été variée, de 50  $\mu$ l à 150  $\mu$ l. Nous n'avons eu toutefois aucune expression *in vivo* de CYP2D6 dans nos cellules B autologues transformées, ou celle-ci est trop faible pour être détectée (Figure 20). Nous avons commandé un test de transfection afin de déterminer le taux de transfection des cellules. Ce test a déterminé que le taux est d'environ 10-20%, mais ce test n'est pas un contrôle positif de la transfection de CYP2D6 en tant que telle, puisqu'elle utilise un vecteur différent.

### ***Immunofluorescence***

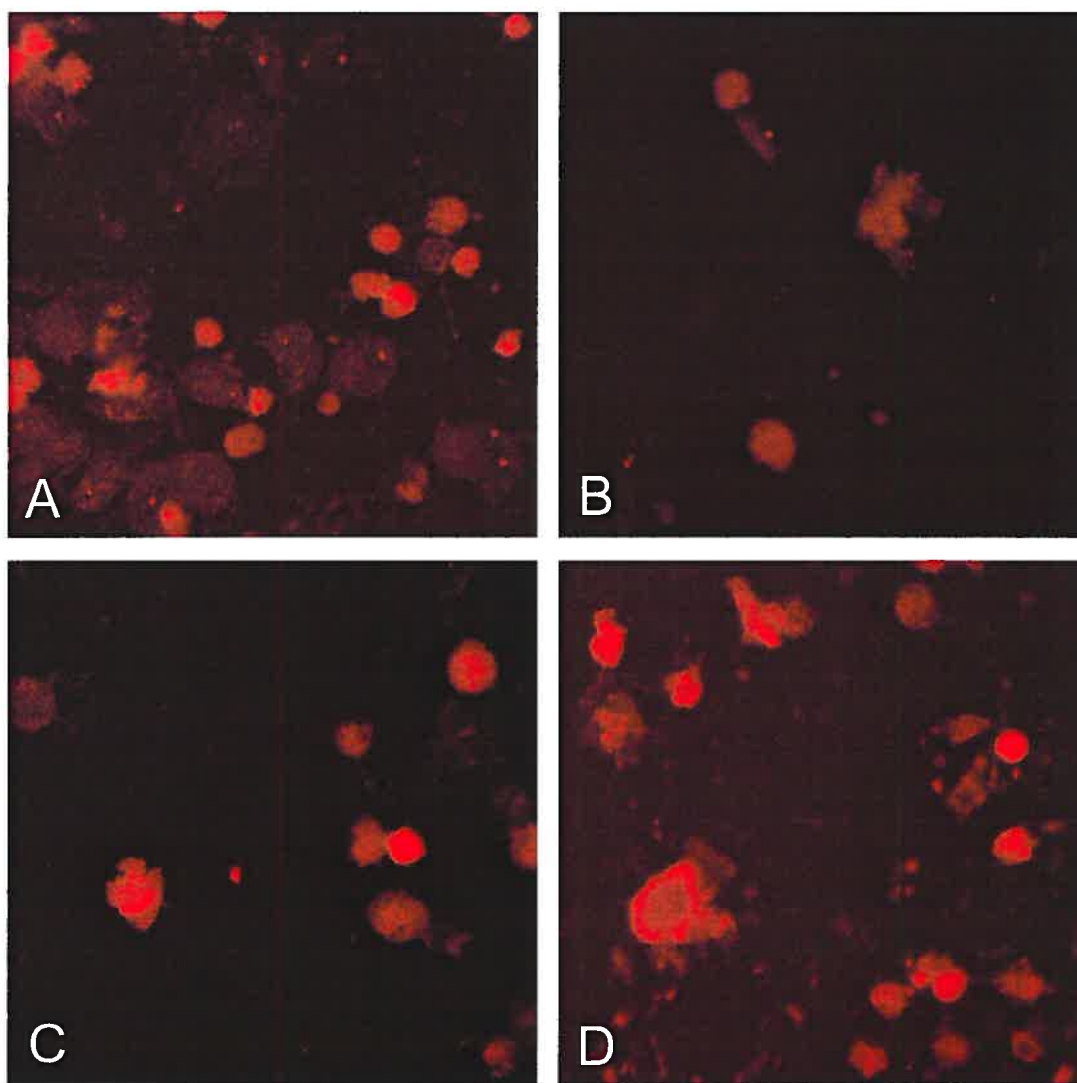
Afin de vérifier directement que l'ADNc du CYP2D6 a bien été transfecté dans les cellules B autologues transformées, nous avons effectué plusieurs tests par immunofluorescence. Les tests ont été effectués sur 50,000 de ces cellules, à l'aide d'un premier anticorps contre CYP2D6 humain, généré chez le lapin et d'un second anticorps, anti-IgG de lapin couplé à la rhodamine. Comme le démontre notre contrôle négatif effectué sur des cellules non transfectées, le bruit de fond était très élevé (Figure 21). Une grande part des cellules non transfectées dans le contrôle négatif sont marquées comme si elles étaient positives, bien qu'elles ne le soient pas. Tous les échantillons (certains non montrés) étaient semblables à ce contrôle. Nous avons voulu



**Figure 20 : Détection de l'expression de CYP2D6 par immunobuvardage effectuée sur des cellules B transformées par le VEB et transfectées par le complexe lipovec (Invivogen) et pCMV-Script-2D6.** Rangée 1, contrôle positif : fraction microsomale de foie; rangées 2-4, échantillons correspondant à 50, 100 et 150 µl de complexe lipovec/CYP2D6 utilisé; rangée 5, contrôle négatif (cellules non-transfectées).

**Figure 21 : Détection de l'expression de CYP2D6 par immunofluorescence effectuée sur des cellules B transformées par le VEB et transfectées par le complexe lipovec (Invivogen) et pCMV-Script-2D6.** A, contrôle négatif sur des cellules non-transfectées; B, second anticorps seulement sur cellules non transfectées (anti-lapin anti-IgG couplé rhodamine 1/400); C, anticorps primaire de lapin anti-CYP2D6 1/600, cellules transfectées avec 50 µl de complexe lipovec/CYP2D6; D, anticorps primaire de lapin anti-CYP2D6 1/200, cellules transfectées avec 50 µl de complexe lipovec/CYP2D6.





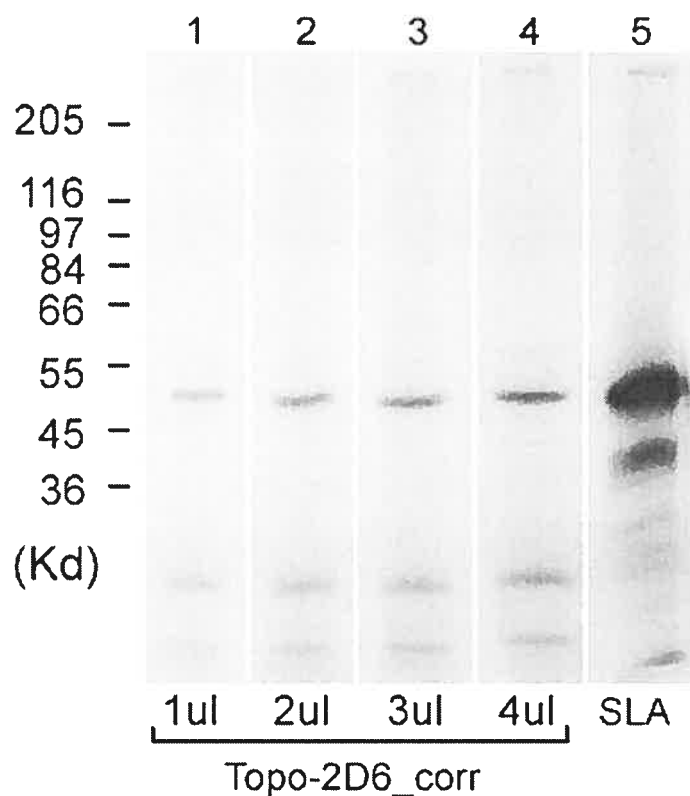
savoir lequel des deux anticorps (primaire ou secondaire) causait cette luminescence non spécifique. Une des conditions de l'expérience comportait seulement le second anticorps afin de déterminer si c'était celui-ci qui causait la liaison non spécifique. Comme le démontre la figure 20B, le deuxième anticorps ne se lie pas du tout aux cellules et est donc très spécifique à l'anticorps primaire. Le problème devrait donc être dû à ce dernier. Il peut y avoir des anticorps dans le sérum de lapin qui vont se lier sur les cellules B et causer ainsi un fort bruit de fond.

### ***Expression in vitro de CYP2D6***

L'immunofluorescence ne donnant pas de résultats interprétables et, afin de vérifier la reconstruction de CYP2D6, nous avons utilisé le vecteur Topo-2D6 afin de traduire la protéine *in vitro* à l'aide de la méthode de lysats de réticulocytes. Nous n'avons eu aucun problème à obtenir la protéine, comme le montre la figure suivante (Figure 22). Les bandes situées à 48 kDa correspondent à CYP2D6. Ce test signifie donc que notre protéine est exprimable dans un environnement *in vitro*, mais ne signifie pas nécessairement qu'elle soit produite *in vivo*.

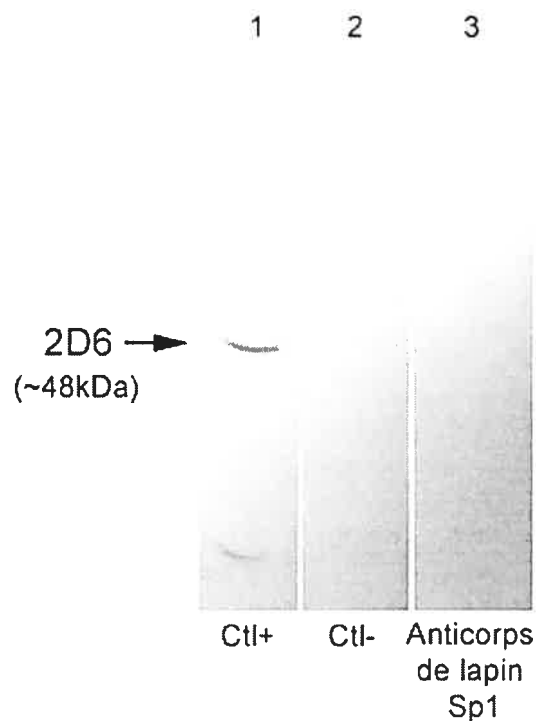
### ***Immunoprécipitation***

Comme méthode alternative à l'immunofluorescence, nous avons décidé d'effectuer une immunoprécipitation. Nous avons tout d'abord testé un anticorps de lapin anti-CYP2D6 (Sp1) puisque celui-ci n'avait jamais été utilisé à cette fin. La figure 23 nous indique que l'anticorps de lapin ne fonctionne pas en immunoprécipitation, contrairement au sérum du patient LKM1<sup>+</sup> servant de contrôle positif pour l'expérience. Nous avons utilisé la protéine radio-marquée générée par traduction *in vitro* comme source de CYP2D6. Nous avons donc continué à utiliser le sérum du patient HAI001 (LKM1<sup>+</sup>) pour la suite des expériences.



**Figure 22 : Traduction *in vitro* du plasmide TOPO-2D6.** Rangées 1-4, 1 µl, 2 µl, 3 µl et 4 µl respectivement d'échantillons provenant des protéines marquées au  $^{35}\text{S}$  générées par traduction *in vitro* au moyen de réticulocytes de lapin; rangée 5, contrôle positif : antigènes solubles du foie contenant une protéine à 48 kDa. Film exposé pendant 16 heures à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le marqueur utilisé est le High Range (Sigma).

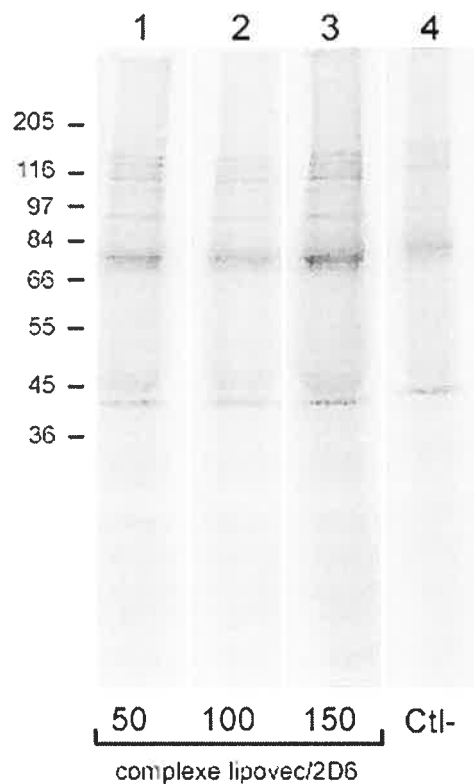
SLA : Antigène soluble du foie (soluble liver antigen)



**Figure 23 : Test de l'anticorps de lapin anti-CYP2D6 (Sp1) contre la protéine marquée, obtenue par traduction *in vitro*, par immunoprécipitation.** Rangée 1, contrôle positif utilisant un sérum de patient LKM1<sup>+</sup> comme anticorps primaire; rangée 2, contrôle négatif utilisant un sérum d'individu sain (LKM1<sup>-</sup>); rangée 3, test de l'anticorps de lapin anti-CYP2D6 (Sp1). Film exposé pendant 16 heures à -80 °C.

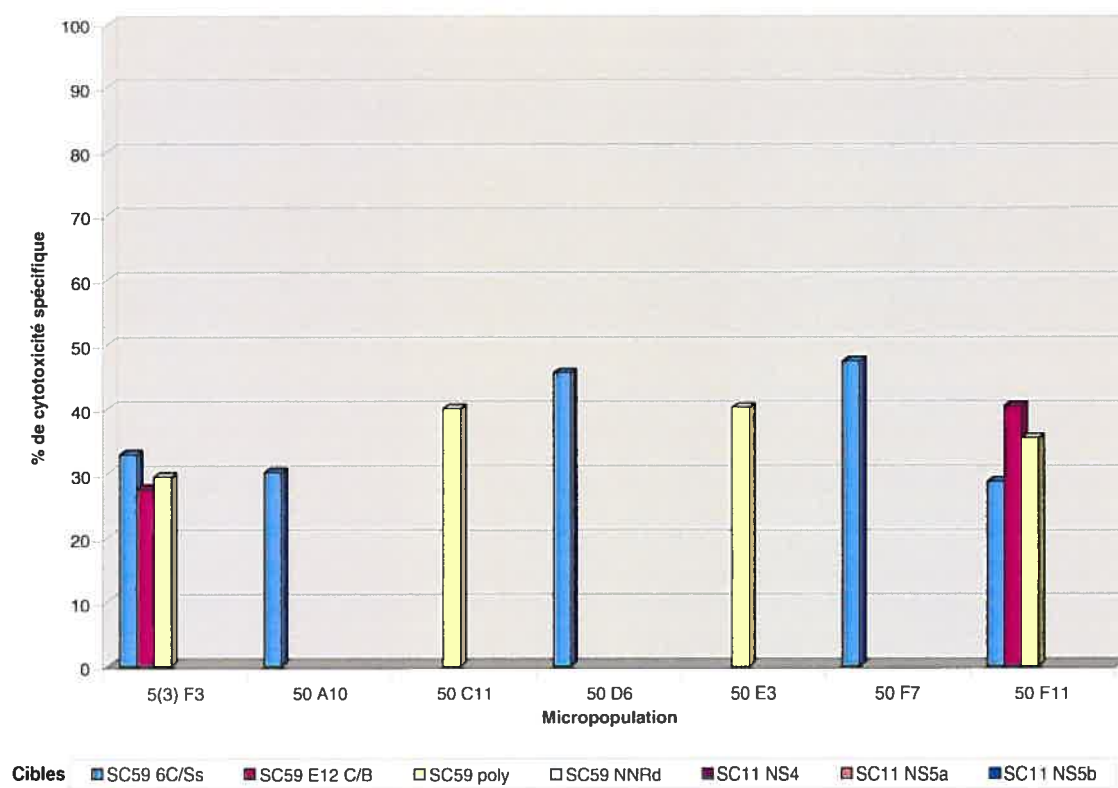
Nous avons donc procédé à une immunoprécipitation à partir des cellules transfectées ; les protéines totales sont marquées au  $^{35}\text{S}$  et récupérées afin de procéder à la manipulation. Nous avons essayé 3 conditions de transfections, soit 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  et 150  $\mu\text{l}$  de complexe lipovec/CYP2D6 et analysé chacune. Tous les profils des échantillons furent identiques au contrôle négatif (Figure 24). La quantité de CYP2D6 est soit trop faible pour être détectée, ou absente.

Nous avons décidé, même si nous ne pouvions confirmer la présence de CYP2D6 dans les cellules B transfectées, de procéder à un dernier test de cytotoxicité, en ajoutant cette fois-ci une 8<sup>ième</sup> cible aux sept cibles VHC, soit les cellules transfectées avec l'ADNc du CYP2D6. Si nous obtenons des clones positifs pour cette cible, nous pourrions donc confirmer le succès des transfections. De plus, si la même micropopulation positive pour CYP2D6 réagit contre un épitope du VHC, nous aurons donc prouvé, ou renforcé, l'hypothèse du mimétisme immunitaire entre le VHC et le CYP2D6 cible des LKM1. Les résultats des micropopulations positives lors de ce test sont présentés à la figure 25. Nous avons pu obtenir sept micropopulations positives pour le VHC ayant entre 30% et 40% de cytotoxicité, mais aucune pour CYP2D6. Nous pouvons donc affirmer que, en tenant compte des résultats négatifs des expériences précédentes, nous n'avons pu transfecter CYP2D6 dans les cellules B autologues. Dans l'éventualité où la transfection avait eu lieu, l'absence de micropopulation contre CYP2D6 n'aurait pas nécessairement infirmé l'hypothèse du mimétisme immunitaire. La quantité totale de populations n'aurait pas été assez grande pour tirer des conclusions significatives. Nous aurions donc refait d'autres tests afin d'augmenter les chances de trouver des clones positifs contre CYP2D6.



**Figure 24 : Immunoprécipitation de CYP2D6 transfecté par le complexe lipovec dans des cellules B transformées par le VEB, dont les protéines sont marquées au  $^{35}\text{S}$ .** Rangée 1-3, échantillons provenant de transfections (50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  et 150  $\mu\text{l}$  de complexe lipovec/CYP2D6 respectivement) effectuées sur des cellules B transformées par EBV dont les protéines ont été marquées au  $^{35}\text{S}$ ; rangée 4, contrôle négatif (cellules non-transfectées). Film exposé pendant 72 heures à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le marqueur utilisé est le High Range (Sigma).

**Figure 25 : Réponses cytotoxiques des cellules T du patient HAI001 LKM1<sup>+</sup> infecté par le VHC-1b, test #5.** Les cellules B transformées (cibles) sont infectées 16 heures avant le test par les 7 recombinaux vaccinia exprimant différentes portions de la polyprotéine du VHC (voir figure 6), pour être ensuite chargées de <sup>51</sup>chromate de sodium. Les cellules T CD8<sup>+</sup> (effecteurs) sont ajoutées aux cellules cibles et incubées 5 heures. Enfin, la quantité de radiotraceur relâché au surnageant est enfin mesuré au moyen d'un compteur gamma.





### ***Tri des cellules positives pour CYP2D6***

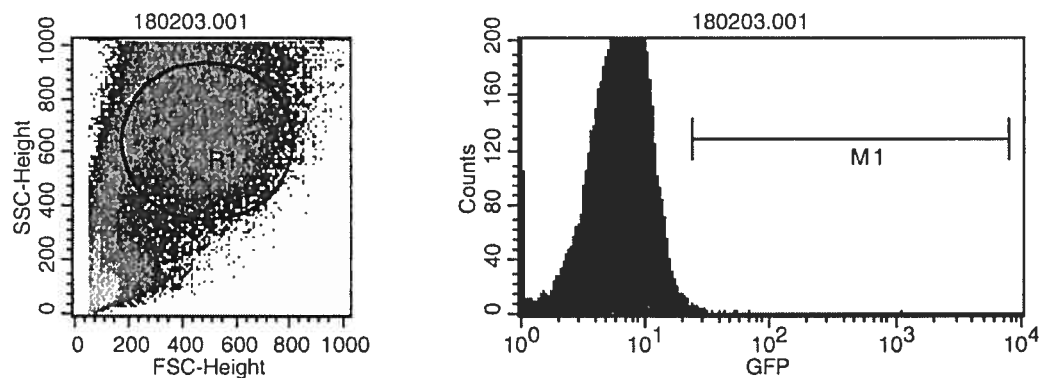
En dernier lieu, nous avons décidé de faire un tri cellulaire sur les cellules transfectées avec pCMV-2D6 afin de les concentrer et éliminer les cellules non transfectées. Nous avons procédé à une cotransfection à l'aide de pCMV-Script-2D6 et pSR $\alpha$ -GFP (green fluorescent protein), pSR $\alpha$ -GFP servant à marquer les cellules pour le tri. Ceci nous permettra de passer les cellules en cytométrie en flux, afin de déterminer si, d'après le pourcentage de transfection, nous devons continuer notre expérience.

L'analyse par cytométrie en flux a révélé que, pour la transfection avec 50  $\mu$ l de complexe lipovec/CYP2D6, nous obtenions environ 3% de cellules positives pour la GFP (Figure 26). Sur cette figure, nous voyons clairement la formation d'un nouveau pic qui représente les cellules exprimant la GFP. Nous avons donc décidé de passer toutes les cellules des transfections à 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l et 150  $\mu$ l de complexe lipovec/CYP2D6 par ml sur un total de 3 ml pour chaque échantillon ( $9 \times 10^6$  cellules) au tri cellulaire. Nous aurions pu ajouter un contrôle négatif à l'expérience, soit des cellules transfectées sans ADN.

Le niveau de bruit de fond des cellules non transfectées est assez fort, mais n'empêche pas de distinguer les cellules positives des négatives. La région de porte d'acquisition a été choisie parce que les cellules B transformées sont plus grosses (FSC plus élevé) et plus granuleuses (SSC plus élevé). Les cellules dont le niveau FSC/SSC est faible sont des cellules mortes et n'ont donc pas été prises en comptes.

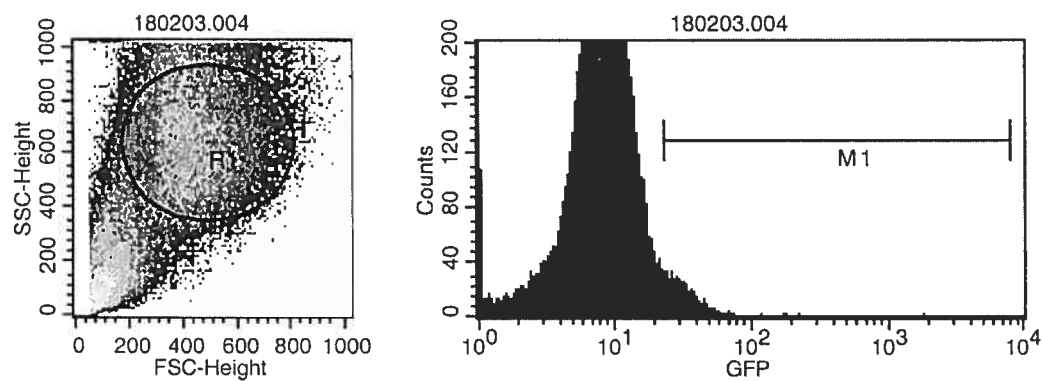
Ayant déterminé que la transfection fonctionnait, nous avons par la suite procédé au tri cellulaire. Les cellules récupérées en culture devraient donc essentiellement être celles qui ont le gène de résistance au G418. Le gène de résistance sera gardé par la cellule puisque nous les mettrons en milieu de sélection à la G418.

**Figure 26 : Analyse en cytométrie en flux des cellules B du patient HAI001 transfectées avec CYP2D6 au moyen du complexe lipovec/CYP2D6.** Les cellules ont été analysées selon la présence ou non du plasmide pSR $\alpha$ -GFP exprimant la green fluorescent protein (GFP), co-transfecté avec le plasmide pCMV-Script-2D6. Le panneau A montre le contrôle négatif (cellules B du patient HAI001 non-transfectées). Le panneau B montre l'analyse effectuée suite à la transfection de 50  $\mu$ l de complexe lipovec/CYP2D6. Les données recueillies lors de l'analyse sont montrées sous chacun des panneaux correspondants.



A

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	31923	100.00	33.21	6.89	6.09	96.31	6.44	1
M1	24, 7915	50	0.16	0.05	48.37	29.47	295.33	25.25	23



B

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	41864	100.00	41.86	9.37	8.03	108.06	8.43	1
M1	24, 7915	1224	2.92	1.22	33.58	31.27	147.05	29.83	25

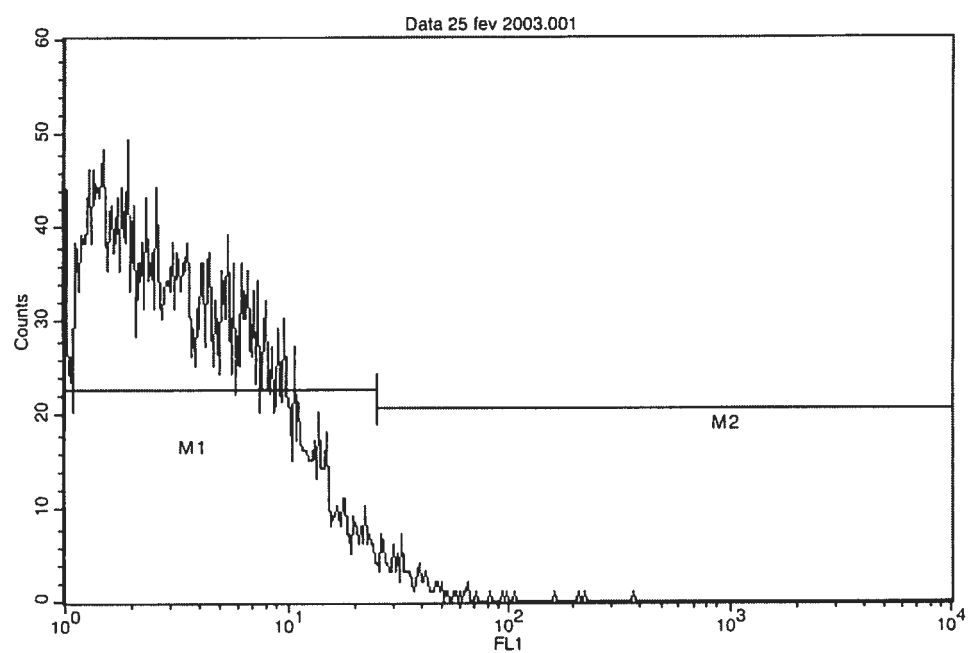
Le tri cellulaire (Figure 27) nous a permis d'isoler 330,000 cellules positives. Les paramètres du trieur ont été réglés afin de ne récupérer que les cellules qui sont définitivement transfectées. Ainsi, le pourcentage de cellules récupérées de 3.6% ne représente pas le pourcentage réel de cellules transfectées.

L'échantillon ayant le plus gros pic et donc le meilleur taux d'incorporation des plasmides, est la condition à 150  $\mu\text{l/ml}$  montrée à la figure 27, par rapport au contrôle négatif (cellules non transfectées). Comme expérience additionnelle, il serait bon de tester plusieurs autres quantités de complexes lipovec/CYP2D6 comme 300  $\mu\text{l/ml}$ , 400  $\mu\text{l/ml}$ , etc. afin de voir le point où l'ajout de complexe n'influencera plus le taux de transfection. La quantité de complexes optimale pourra ainsi être déterminée.

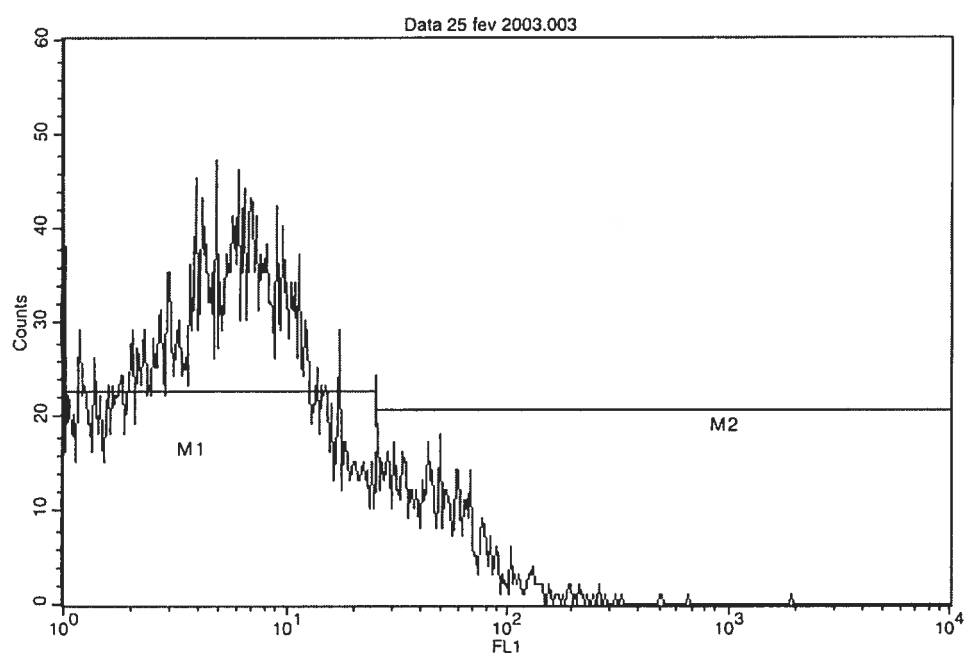
Vingt-quatre heures plus tard, nous avons placé les cellules dans un milieu de sélection à la généticine (G418) à 400  $\mu\text{g/mL}$  en changeant 75% du milieu aux 3-4 jours, en dérangeant le moins possible les cellules. Cette concentration de G418 a été déterminée en mettant des cellules non transfectées avec diverses concentrations d'antibiotique. La concentration choisie est celle où les cellules non transfectées meurent dans un délai d'environ 10 jours.

À ce jour, nous n'avons pas encore réussi à isoler des populations de cellules B transfectées avec CYP2D6 résistantes au G418, mais l'expérience est toujours en cours.

**Figure 27 : Tri des cellules B du patient HAI001 transfectées avec CYP2D6 au moyen du complexe lipovec/CYP2D6.** Les cellules ont été triées selon la présence ou non du plasmide pSR $\alpha$ -GFP exprimant la green fluorescent protein (GFP), co-transfecté avec le plasmide pCMV-Script-2D6. Le panneau A montre le contrôle négatif, soit des cellules B du patient HAI001 non-transfectées. Le panneau B montre les résultats du triage effectué suite à la transfection de 150  $\mu$ l de complexe lipovec/CYP2D6.



A



B

## Discussion générale

Par l'entremise de ce projet, nous avons tenté de vérifier si certaines composantes de la réponse cellulaire antivirale contre le virus de l'hépatite C (VHC) sont dirigées contre les antigènes du soi (mimétisme moléculaire). Pour ce faire, nous avons établi 3 objectifs principaux qui nous permettront de la vérifier. 1) Identifier les autoantigènes et les clones de lymphocytes T responsables du déclenchement et de l'exacerbation de l'hépatite chronique induite par le VHC. 2) Comprendre mieux la relation entre le VHC et la réponse autoimmune. 3) Déterminer s'il y a mimétisme immunitaire entre la polyprotéine du VHC et le CYP2D6.

La première étape de notre projet était la dérivation des clones T (Figure 9). Nous avons cloné les lymphocytes T du patient HAI001 LKM1<sup>+</sup> afin de générer des micropopulations monoclonales. Ces lymphocytes ont été obtenus du sang périphérique par gradient de Ficoll (Tableau 1) ainsi qu'à partir d'échantillons de foie et ont été stimulés par la PHA. Les micropopulations de lymphocytes ont été soumises à un test de cytotoxicité qui nous a permis d'en isoler 40 qui étaient VHC-spécifiques, pouvant être testées contre des cibles exprimant CYP2D6.

Pour ce faire, nous avons, comme deuxième étape du projet (Figure 7), procédé à la construction des plasmides pouvant exprimer le CYP2D6 pour la transfection dans des cellules B autologues transformées par le VEB. Nous avons tout d'abord préparé le vecteur pSR $\alpha$ -puro-2D6 (Figure 13), puis nous l'avons utilisé pour transfecter ces cellules, soit par électroporation, soit au moyen de d'un kit utilisant la lipofectamine. Les résultats de ces transfections transitoires ont été analysés par immunobuvardage ; aucune expression de CYP2D6 n'a été détectée (figure 14). Dans le cas des transfections stables, les cellules n'ont pas survécu à la sélection par l'antibiotique puromycine.

Après séquençage de CYP2D6 pour fin de vérification, nous avons constaté l'absence de l'ATG du gène pouvant expliquer l'absence d'expression de la protéine dans les cellules B. (3'-GGG CTA...-5' au lieu de 3'-ATG GGG CTA...-5', Figure 19) ; Il a fallu procéder à sa reconstruction par PCR. Dans un premier temps nous n'avons pas réussi à obtenir un produit de PCR convenable pour procéder à son sous-clonage. Afin de résoudre ce problème, nous avons procédé d'abord à définir les concentrations idéales de  $MgCl_2$  et la température optimale de la réaction (Figure 15). Nous avons par la suite vérifié la spécificité de nos amorces au moyen de diverses réactions de PCR et effectué quelques contrôles à l'aide d'amorces déjà testées provenant d'un autre laboratoire (Figure 16). Après toutes ces vérifications, nous avons déterminé que la quantité de matériel de départ, soit l'ADNc de CYP2D6, était insuffisante ; nous l'avons donc augmentée cinq fois. Ceci nous a permis d'obtenir un produit de PCR correspondant à nos attentes (CYP2D6 complet) que nous avons cloné dans le vecteur porteur pCRII-Topo (Figure 17). L'expression de CYP2D6 a ensuite été effectuée dans un système de traduction *in vitro* utilisant des réticulocytes de lapin afin de vérifier la qualité du produit. Nous avons pu obtenir sans aucun problème une expression de la protéine CYP2D6 reconnue par des autoanticorps LKM1 (Figure 22).

Par la suite, n'ayant pas réussi à détecter l'expression de CYP2D6 à l'aide de pSR $\alpha$ -puro-2D6 et, ayant des doutes quant à l'efficacité du promoteur SR $\alpha$  de ce vecteur dans notre lignée B, nous avons préféré nous tourner vers le vecteur pCMV-Script, propre à l'expression eukaryotique et sélectionnable au moyen du G418 (Figure 18).

Nous avons par la suite procédé à la transfection et l'expression de CYP2D6 dans les cellules B autologues transformées par le VEB. Le complexe lipovec a été utilisé pour toutes les transfections subséquentes de ce projet. Celles-ci ont été analysées par deux méthodes. La première étant l'immunobuvardage que ne nous a pas permis de détecter l'expression de CYP2D6 (Figure 20).



Nous avons donc opté pour utiliser l'immunofluorescence afin d'analyser d'autres transfections. Après avoir tenté une première expérience à l'aide d'un antisérum provenant d'un patient LKM1<sup>+</sup> et d'un second, anti-humain, couplé au FITC, nous avons constaté que nos échantillons étaient tous identiques au contrôle négatif. Celui-ci comportait énormément de luminescence non spécifique (bruit de fond). Ayant utilisé un second anticorps anti-humain, nous avons refait l'expérience, mais cette fois en utilisant un premier anticorps anti-CYP2D6 généré chez le lapin, et un anti-lapin couplé à la rhodamine comme second anticorps. Encore ici, nous avons obtenu un contrôle négatif ayant beaucoup de luminescence non spécifique (Figure 21). Un contrôle comportant seulement le second anticorps nous a permis d'identifier, dans les deux cas, que la cause de cette luminescence non spécifique était l'anticorps primaire. Nous avons donc dû mettre de côté l'immunofluorescence, n'ayant pas de moyen de contourner ce problème.

L'expression de CYP2D6 a par la suite été mesurée par immunoprécipitation, directement à partir des protéines totales marquées au <sup>35</sup>S des cellules B transfectées, en utilisant un anticorps monoclonal anti-CYP2D6 (MAB-2D6). Encore ici, trois conditions de transfections ont été testées par cette méthode. Les résultats obtenus pour cette expérience ne nous ont pas permis de confirmer l'expression de CYP2D6, n'ayant obtenu aucune bande à la hauteur désirée (Figure 24).

N'étant toujours pas capable de confirmer l'expression de CYP2D6 par les cellules transfectées, nous avons développé un procédé de cotransfection avec un plasmide exprimant la green fluorescent protein (GFP) afin de pouvoir analyser les cellules par cytométrie en flux et les trier. L'analyse par cytométrie en flux a révélé une expression de la GFP dans les cellules transfectées, proportionnelle à la quantité de complexes utilisée (Figure 26). Nous avons donc procédé immédiatement au tri cellulaire des cellules exprimant la GFP. Ceci nous a permis d'isoler 330,000 cellules positives et

donc, normalement aussi positives pour le gène de résistance à la G418 situé sur le même vecteur que le CYP2D6. Nous les avons placées en sélection pendant plus d'un mois à une concentration de G418 pré déterminée. À ce jour, nous n'avons pas encore réussi à isoler de population résistante au G418 mais cette expérience se poursuit. Nous pensons donc que la construction pCMV-Script-2D6 n'est probablement pas encore totalement mise au point pour l'expression de CYP2D6 puisque la transfection a bien eu lieu pour la GFP. Nous n'avons cependant aucune façon directe de savoir si la transfection a fonctionné ou non, mis à part le contrôle positif, qui n'utilisait pas notre vecteur, mais un vecteur contrôle exprimant lacZ (test de beta-galactosidase). Afin de savoir si la transfection en soi est un problème, nous pourrions essayer de l'effectuer sur un autre type cellulaire, comme les cellules HepG2 par exemple, reconnues pour leur facilité de transfection (ces cellules n'expriment pas CYP2D6 au départ). Nous pourrions ensuite tester l'expression de CYP2D6 comme nous l'avons fait auparavant. D'un autre côté, nous pourrions essayer d'autres moyens de transfection (lipofectamine 2000 et transfectam). Nous ne pourrions cependant pas utiliser les cellules HepG2 lors de tests de cytotoxicité puisqu'elles ne sont pas autologues. Les effecteurs réagiraient tous contre ces cellules et nous aurions un niveau de 100% de cytotoxicité.

Nous avons toutefois voulu effectuer un test de cytotoxicité utilisant, en plus des cibles utilisées précédemment, les cellules B transfectées comme huitième cible, étape 3 du projet (Figure 8). Nous avons obtenu comme attendu plusieurs micropopulations VHC-spécifiques, mais aucune qui étaient CYP2D6-spécifiques. Deux explications sont possibles ici : 1) La fréquence de cellules T présentant une réactivité croisée est faible, par conséquent, nous n'avons pas encore testé assez de micropopulations contre CYP2D6 pour pouvoir en trouver une qui soit positive ou 2) l'expression de CYP2D6 n'a effectivement pas lieu.

Afin de poursuivre ce projet, les micropopulations obtenues lors de tests de cytotoxicité pourront être analysées afin de déterminer les épitopes du VHC qui sont reconnus ; ceux-ci pourront être comparés à la séquence de CYP2D6 afin de retrouver, par prédictions informatiques, des peptides potentiels qui renforceraient notre hypothèse de départ<sup>160,161</sup>. Nous pourrions aussi utiliser les micropopulations afin de les tester chacune contre plusieurs cibles contenant chacune un peptide de CYP2D6 incorporé par un recombinant vaccinia (selon le même principe que les cibles VHC), afin de tester directement leur réactivité. Une fois toutes les cibles (contenant tous les peptides de CYP2D6) obtenues, nous pourrions les utiliser dans les tests de cytotoxicité. Cette méthode pourrait être plus aisée que celle faisant appel à la transfection et pourrait uniformiser les expériences. Nous pouvons aussi utiliser des panels de peptides déjà disponibles (étape 4, Figure 8) afin de les mettre chacun en présence de cellules CD8<sup>+</sup> et mesurer par la suite la relâche d'interféron  $\gamma$ . Il est aussi possible d'incuber les peptides avec des cellules B (elles présenteront alors en partie ces peptides) et de les utiliser comme cibles dans les tests de cytotoxicité. Cela nous permettra de savoir quels clones ont réagi avec un peptide en particulier et de cartographier le ou les épitopes de CYP2D6 reconnus par les micropopulations VHC-spécifiques. Nous pourrions comparer les séquences des peptides obtenues entre le VHC et CYP2D6 par des logiciels informatiques. Nous voulons en dernier lieu (étape 5, Figure 8) tester les micropopulations contre les hépatocytes autologues afin de se rapprocher des conditions *in vivo* chez le patient LKM1<sup>+</sup>.

Si un nouvel anticorps anti-CYP2D6 vient à voir le jour, nous pourrions le tester en immunofluorescence et regarder si nous avons aussi un fort bruit de fond. Si ce n'est pas le cas, nous pourrions donc disposer d'un moyen de vérifier le taux de réussite des transfections et nous serons capables de nous ajuster en conséquence. Malheureusement, pour l'instant, le choix est très restreint. Le seul anticorps commercial anti-CYP2D6 trouvé ne fonctionne qu'en immunobuvardage.

Notre projet nous a permis d'isoler des micropopulations qui pourront être caractérisées et testées contre CYP2D6 par le biais des méthodes que nous développons. Les expériences effectuées et futures de ce projet permettront de mieux comprendre le mécanisme de l'autoimmunité hépatique et d'établir une association directe avec l'infection par le VHC. Elles nous permettront d'obtenir d'importantes informations et données en vue de procurer de meilleurs diagnostics et traitements pour les gens qui souffrent de cette maladie.

## Bibliographie

1. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-8 (2000).
2. Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. & Graham, N. M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 223-43 (1997).
3. Rose, N. R. Pathogenic mechanisms in autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* **53**, S7-16 (1989).
4. Czaja, A. J., Manns, M. P., McFarlane, I. G. & Hoofnagle, J. H. Autoimmune hepatitis: the investigational and clinical challenges. *Hepatology* **31**, 1194-200 (2000).
5. Shoenfeld, Y. & Isenberg, D. in *Research Monography in Immunology* 53-74 (Elsevier, Amsterdam, 1989).
6. Farnam, J., Lavastida, M. T., Grant, J. A., Reddi, R. C. & Daniels, J. C. Antinuclear antibodies in the serum of normal pregnant women: a prospective study. *J Allergy Clin Immunol* **73**, 596-9 (1984).
7. Fritzler, M. J., Pauls, J. D., Kinsella, T. D. & Bowen, T. J. Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-Sjogren's syndrome antigen A (SS-A/Ro) antibodies in female blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* **36**, 120-8 (1985).
8. Gabay, C. & Kahn, M. F. [Male-type scleroderma: the role of occupational exposure]. *Schweiz Med Wochenschr* **122**, 1746-52 (1992).
9. Stone, O. J. Autoimmunity as a secondary phenomenon in scleroderma (and so-called human adjuvant disease). *Med Hypotheses* **34**, 127-30 (1991).
10. Mazziotti, G. et al. Temporal relationship between the appearance of thyroid autoantibodies and development of destructive thyroiditis in patients undergoing treatment with two different type-1 interferons for HCV-related chronic hepatitis: a prospective study. *J Endocrinol Invest* **25**, 624-30 (2002).
11. Chung, Y. H. & Shong, Y. K. Development of thyroid autoimmunity after administration of recombinant human interferon-alpha 2b for chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* **88**, 244-7 (1993).
12. Meyer, O. *Autoanticorps : Marqueurs des maladies auto-immunes* (BMD éditions, Paris, 1999).
13. Rose, N. R. & Mackay, I. R. (eds.) *The Autoimmune Diseases II* (Academic Press, Inc., San Diego, 1992).
14. Nerup, J. & Lernmark, A. Autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* **70**, 135-41 (1981).
15. Maclaren, N. K. Viral and immunological bases of beta cell failure in insulin-dependent diabetes. *Am J Dis Child* **131**, 1149-54 (1977).
16. Humbel, R. L. *Auto-anticorps et maladies auto-immunes* (Éditions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 1997).
17. Pelfrey, C. M. & Steinberg, A. D. in *The Autoimmune Diseases II* (eds. Rose, N. R. & Mackay, I. R.) 107-126 (Academic Press inc., San Diego, 1992).
18. Chen, P. P., Fong, S. & Carson, D. A. Rheumatoid factor. *Rheum Dis Clin North Am* **13**, 545-68 (1987).
19. Harris, E. D., Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* **322**, 1277-89 (1990).
20. Rossa, A. D. in *The Decade of autoimmunity* (ed. Shoenfeld, Y.) 431 (Elsevier science B. V., Amsterdam, 1999).
21. Choo, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-62 (1989).
22. Conry-Cantilena, C. et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **334**, 1691-6 (1996).
23. Kolykhalov, A. A. et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-4 (1997).

24. Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. & Choo, Q. L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* **14**, 381-8 (1991).
25. Di Bisceglie, A. M. Hepatitis C. *Lancet* **351**, 351-5 (1998).
26. Moradpour, D., Wolk, B., Cerny, A., Heim, M. H. & Blum, H. E. Hepatitis C: a concise review. *Minerva Med* **92**, 329-39 (2001).
27. Bonkovsky, H. L. & Mehta, S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol* **44**, 159-82 (2001).
28. Davidson, F. et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* **76** ( Pt 5), 1197-204 (1995).
29. Di Bisceglie, A. M. et al. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* **14**, 969-74 (1991).
30. Seeff, L. B. et al. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med* **327**, 1906-11 (1992).
31. Shakil, A. O. et al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med* **123**, 330-7 (1995).
32. Yano, M. et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23**, 1334-40 (1996).
33. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel Statement: management of hepatitis C. *Hepatology* **26**, 2S-10S (1997).
34. Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* **15**, 5-14 (1995).
35. Michitaka, K. et al. Analysis of hepatitis C virus genome in patients with autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* **106**, 1603-10 (1994).
36. Agnello, V., Chung, R. T. & Kaplan, L. M. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* **327**, 1490-5 (1992).
37. Shindo, M. et al. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* **115**, 700-4 (1991).
38. Hoofnagle, J. H. et al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* **315**, 1575-8 (1986).
39. Poynard, T. et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* **24**, 778-89 (1996).
40. Marcellin, P. et al. Long-term histologic and viral changes in patients with chronic hepatitis C who responded to alpha interferon. *Liver* **14**, 302-7 (1994).
41. Ma, Y. et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* **35**, 658-64 (2002).
42. Vitozzi, S., Lapierre, P., Djilali-Saiah, I. & Alvarez, F. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* **262**, 103-10 (2002).
43. McFarlane, I. G. Autoimmune hepatitis: Clinical manifestations and diagnostic criteria. *Can J Gastroenterol* **15**, 107-13 (2001).
44. Manns, M. P. & Strassburg, C. P. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* **120**, 1502-17 (2001).
45. Waldenstrom, J. Leber, blutprotein und Nahrungsweiss. *Deutsch Gesellschaft Z Verdau Stoffwechselkr* **15**, 113-9 (1950).
46. Joske, R. A. & King, W. E. The LE cell phenomenon in active chronic viral hepatitis. *Lancet* **ii**, 477-80 (1955).
47. Saint, E. G. & King, W. E. The course of infectious hepatitis with special reference to prognosis and chronic stage. *Aust Ann Med* **2**, 113-27 (1953).
48. Mackay, I. R. Lupoid hepatitis. *Lancet* **ii**, 1323-6 (1956).
49. Mackay, I. R. Lupoid hepatitis and the hepatic lesions of systematic lupus erythematosus. *Lancet* **i**, 65-9 (1959).
50. Mackay, I. R., Weiden, S. & Hasker, J. Autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci* **124**, 767-80 (1965).

51. Czaja, A. J. The variant forms of autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* **125**, 588-98 (1996).
52. Johnson, P. J. & McFarlane, I. G. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* **18**, 998-1005 (1993).
53. Alvarez, F. et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* **31**, 929-38 (1999).
54. Lashner, B. A. et al. Chronic hepatitis: disease factors at diagnosis predictive of mortality. *Am J Med* **85**, 609-14 (1988).
55. Krawitt, E. L. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* **334**, 897-903 (1996).
56. Lapiere, P., Hajoui, O., Homberg, J. C. & Alvarez, F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **116**, 643-9 (1999).
57. Obermayer-Straub, P., Strassburg, C. P. & Manns, M. P. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* **32 Suppl 1**, 181-97 (2000).
58. Janeway, C. A. & Travers, P. *Immunobiology : The immune system in health and disease* (Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., New York, 1997).
59. Mackay, I. R. & Morris, P. J. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. *Lancet* **2**, 793-5 (1972).
60. Seki, T., Kiyosawa, K., Inoko, H. & Ota, M. Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology* **12**, 1300-4 (1990).
61. Opelz, G., Vogten, A. J., Summerskill, W. H., Schalm, S. W. & Terasaki, P. I. HLA determinants in chronic active liver disease: possible relation of HLA-Dw3 to prognosis. *Tissue Antigens* **9**, 36-40 (1977).
62. Krawitt, E. L. et al. Immunogenetic studies of autoimmune chronic active hepatitis: HLA, immunoglobulin allotypes and autoantibodies. *Hepatology* **7**, 1305-10 (1987).
63. Lohr, H. et al. Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* **84**, 297-302 (1991).
64. Manns, M. P. & Obermayer-Straub, P. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* **26**, 1054-66 (1997).
65. Czaja, A. J. in *Immunology and the Liver : Autoimmunity*. (eds. Moreno Otero, R., Clemente Ricote, G. & Garcia-Monzon, C.) 73-83 (Madrid, Spain, 2000).
66. Czaja, A. J. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* **96**, 1224-31 (2001).
67. Nouri-Aria, K. T., Hegarty, J. E., Alexander, G. J., Eddleston, A. L. & Williams, R. Effect of corticosteroids on suppressor-cell activity in "autoimmune" and viral chronic active hepatitis. *N Engl J Med* **307**, 1301-4 (1982).
68. Czaja, A. J., Sievers, C. & Zein, N. N. Nature and behavior of serum cytokines in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* **45**, 1028-35 (2000).
69. Czaja, A. J. & Freese, D. K. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **36**, 479-97 (2002).
70. Milkiewicz, P., Hubscher, S. G., Skiba, G., Hathaway, M. & Elias, E. Recurrence of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Transplantation* **68**, 253-6 (1999).
71. Wiesner, R. H. et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* **28**, 638-45 (1998).
72. Yamamoto, A. M. et al. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. *Clin Exp Immunol* **108**, 396-400 (1997).
73. Maddrey, W. C. Subdivisions of idiopathic autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* **7**, 1372-5 (1987).
74. Homberg, J. C. et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* **7**, 1333-9 (1987).

75. Mertens-Strijthagen, J., De Schrijver, C., Wattiaux-De Coninck, S. & Wattiaux, R. A centrifugation study of rat-liver mitochondria, lysosomes and peroxisomes during the perinatal period. *Eur J Biochem* **98**, 339-52 (1979).
76. Martini, E. et al. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* **8**, 1662-6 (1988).
77. Muratori, L., Cataleta, M., Muratori, P., Lenzi, M. & Bianchi, F. B. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* **42**, 721-6 (1998).
78. Manns, M. P. Viruses and autoimmune liver disease. *Intervirology* **35**, 108-15 (1993).
79. Czaja, A. J., Manns, M. P. & Homburger, H. A. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* **103**, 1290-5 (1992).
80. Obermayer-Straub, P., Strassburg, C. P. & Manns, M. P. Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP- glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol* **14**, 429-39 (2000).
81. Clemente, M. G. et al. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Gastroenterology* **114**, 324-8 (1998).
82. Zignego, A. L. & Brechot, C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* **31**, 369-76 (1999).
83. Al-Khalidi, J. A. & Czaja, A. J. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc* **76**, 1237-52 (2001).
84. Ben-Ari, Z. & Czaja, A. J. Autoimmune hepatitis and its variant syndromes. *Gut* **49**, 589-94 (2001).
85. Mackay, I. R. in *Autoimmune liver diseases* (eds. Krawitt, E. L. & Wiesner, R. H.) 21-42 (1991).
86. Storch, W., Cossel, L. & Dargel, R. The immunoelectron-microscopical demonstration of antibodies against endoplasmic reticulum (microsomes) in chronic aggressive hepatitis and liver cirrhosis. *Immunology* **32**, 941-5 (1977).
87. Alvarez, F., Bernard, O., Homberg, J. C. & Kreibich, G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **161**, 1231-6 (1985).
88. Kyriatsoulis, A. et al. Distinction between natural and pathological autoantibodies by immunoblotting and densitometric subtraction: liver-kidney microsomal antibody (LKM) positive sera identify multiple antigens in human liver tissue. *Clin Exp Immunol* **70**, 53-60 (1987).
89. Waxman, D. J. et al. Antibodies to liver/kidney microsome1 in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P-450. *Gastroenterology* **95**, 1326-31 (1988).
90. Zanger, U. M., Hauri, H. P., Loeper, J., Homberg, J. C. & Meyer, U. A. Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8256-60 (1988).
91. Choudhuri, K., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Cytochrome P4502D6: understanding an autoantigen. *Clin Exp Immunol* **108**, 381-3 (1997).
92. Manns, M. et al. Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P-450 db1 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro but not in vivo. *Hepatology* **12**, 127-32 (1990).
93. Yamamoto, A. M., Cresteil, D., Homberg, J. C. & Alvarez, F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera. *Gastroenterology* **104**, 1762-7 (1993).
94. Gueguen, M. et al. Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimmun* **4**, 607-15 (1991).
95. Yamamoto, A. M., Mura, C., De Lemos-Chiarandini, C., Krishnamoorthy, R. & Alvarez, F. Cytochrome P450IID6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clin Exp Immunol* **92**, 381-90 (1993).



96. Yamamoto, A. M., Cresteil, D., Boniface, O., Clerc, F. F. & Alvarez, F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* **23**, 1105-11 (1993).
97. Manns, M. P., Griffin, K. J., Sullivan, K. F. & Johnson, E. F. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* **88**, 1370-8 (1991).
98. Kitazawa, E. et al. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and -positive patients. *J Autoimmun* **17**, 243-9 (2001).
99. Hijikata, M. et al. CYP2D6 polymorphism and the presence of anti-LKM-1 in patients with chronic hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 922-6 (2000).
100. Miyakawa, H. et al. Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* **33**, 23-32 (2000).
101. Daly, A. K. et al. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* **6**, 193-201 (1996).
102. Chida, M. et al. A new variant CYP2D6 allele (CYP2D6\*21) with a single base insertion in exon 5 in a Japanese population associated with a poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* **9**, 287-93 (1999).
103. Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. & Roots, I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* **60**, 284-95 (1997).
104. Bradford, L. D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* **3**, 229-43 (2002).
105. Weber, W. W. Populations and genetic polymorphisms. *Mol Diagn* **4**, 299-307 (1999).
106. Katoh, T. & Higashi, K. Ethnic differences of the primary gene defect at the cytochrome P-450 2D6. *J Uoeh* **14**, 205-9 (1992).
107. Gonzalez, F. J. et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* **331**, 442-6 (1988).
108. Loeper, J., Le Berre, A. & Pompon, D. Topology inversion of CYP2D6 in the endoplasmic reticulum is not required for plasma membrane transport. *Mol Pharmacol* **53**, 408-14 (1998).
109. Trautwein, C., Ramadori, G., Gerken, G., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Manns, M. Regulation of cytochrome P450 IID by acute phase mediators in C3H/HeJ mice. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 617-23 (1992).
110. Bogdanos, D. P., Muratori, L., Bianchi, F. B. & Vergani, D. Hepatitis C virus and autoimmunity. *Hepatology* **31**, 1380 (2000).
111. Loeper, J., Louerat-Oriou, B., Duport, C. & Pompon, D. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Mol Pharmacol* **54**, 8-13 (1998).
112. Muratori, L. et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* **46**, 553-61 (2000).
113. Cerny, A., Kammer, A. R. & Chisari, F. V. Reply: Hepatitis C and Autoimmune Hepatitis. *Hepatology* **31**, 811-812 (2000).
114. Clemente, M. G. et al. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1353-61 (1997).
115. Ranek, L. Halothane hepatitis. *Arch Toxicol Suppl*, 137-9 (1978).
116. Spracklin, D. K., Hankins, D. C., Fisher, J. M., Thummel, K. E. & Kharasch, E. D. Cytochrome P450 2E1 is the principal catalyst of human oxidative halothane metabolism in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 400-11 (1997).
117. Nanda, N. K., Arzoo, K. K., Geysen, H. M., Sette, A. & Sercarz, E. E. Recognition of multiple peptide cores by a single T cell receptor. *J Exp Med* **182**, 531-9 (1995).
118. Mason, D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* **19**, 395-404 (1998).
119. Kammer, A. R. et al. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med* **190**, 169-76 (1999).

120. Vogel, A., Manns, M. P. & Strassburg, C. P. Autoimmunity and viruses. *Clin Liver Dis* **6**, 451-65 (2002).
121. Roep, B. O. et al. Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. *Ann N Y Acad Sci* **958**, 163-5 (2002).
122. Deshpande, S. P. et al. Herpes simplex virus-induced keratitis: evaluation of the role of molecular mimicry in lesion pathogenesis. *J Virol* **75**, 3077-88 (2001).
123. Zhao, Z. S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P. A. & Cantor, H. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* **279**, 1344-7 (1998).
124. Miyakawa, H. et al. Differences in antigenic sites, recognized by anti-liver-kidney microsome-1 (LKM-1) autoantibody, between HCV-positive and HCV-negative sera in Japanese patients. *J Gastroenterol* **33**, 529-35 (1998).
125. Klein, R., Zanger, U. M., Berg, T., Hopf, U. & Berg, P. A. Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clin Exp Immunol* **118**, 290-7 (1999).
126. Herzog, D. et al. Sera of children with hepatitis C infection and anti-liver-kidney microsome-1 antibodies recognize different CYP2D6 epitopes than adults with LKM+/HCV+ sera. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **29**, 551-5 (1999).
127. Ma, Y. et al. Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* **97**, 94-9 (1994).
128. Durazzo, M. et al. Heterogeneity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology* **108**, 455-62 (1995).
129. Ma, Y. et al. Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule. *J Immunol* **169**, 277-85 (2002).
130. Perez, N., Herzog, D., Jacqz-Aigrain, E., Homberg, J. C. & Alvarez, F. Study of the B cell response to cytochrome P450IID6 in sera from chronic hepatitis C patients. *Clin Exp Immunol* **106**, 336-43 (1996).
131. Manns, M. P. Hepatitis C and autoimmune hepatitis. *Hepatology* **31**, 811-2 (2000).
132. Lohr, H. F. et al. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* **14**, 161-6 (1994).
133. Kerkar, N. et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* **170**, 1481-9 (2003).
134. Lohr, H. F. et al. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* **24**, 1416-21 (1996).
135. Mishiro, S. et al. An autoantibody cross-reactive to hepatitis C virus core and a host nuclear antigen. *Autoimmunity* **10**, 269-73 (1991).
136. Manns, M. P. in *Immunology and the Liver* (eds. Meyer zum Buschefelde, K. H., Hoofnagle, J. H. & Manns, M. P.) (MTP Press, Lancaster, 1993).
137. Lenzi, M. et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* **335**, 258-9 (1990).
138. Lunel, F. et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* **16**, 630-6 (1992).
139. Durazzo, M. et al. [Heterogeneity of antimicrosomal autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection and delta hepatitis]. *Ann Ital Med Int* **10**, 93-7 (1995).
140. Obermayer-Straub, P. & Manns, M. P. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmun* **16**, 275-85 (2001).
141. Sanchez-Urdazpal, L., Czaja, A. J., van Hoek, B., Krom, R. A. & Wiesner, R. H. Prognostic features and role of liver transplantation in severe corticosteroid-treated autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* **15**, 215-21 (1992).

142. Czaja, A. J. Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies. *Dig Dis Sci* **40**, 435-56 (1995).
143. Johnson, P. J., McFarlane, I. G. & Williams, R. Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* **333**, 958-63 (1995).
144. Czaja, A. J. in *Autoimmune liver diseases*. (eds. Krawitt, E. L., Weisner, R. H. & Nishioka, M.) 499-515 (Elsevier, Amsterdam, 1998).
145. Gregorio, G. V. et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* **25**, 541-7 (1997).
146. Levy, G. & Grant, D. Potential for CsA-Neoral in organ transplantation. *Transplant Proc* **26**, 2932-4 (1994).
147. Malekzadeh, R. et al. Cyclosporin A is a promising alternative to corticosteroids in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* **46**, 1321-7 (2001).
148. Debray, D., Maggiore, G., Girardet, J. P., Mallet, E. & Bernard, O. Efficacy of cyclosporin A in children with type 2 autoimmune hepatitis. *J Pediatr* **135**, 111-4 (1999).
149. Alvarez, F. et al. Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. *J Hepatol* **30**, 222-7 (1999).
150. Roberts, S. K., Therneau, T. M. & Czaja, A. J. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **110**, 848-57 (1996).
151. Vergani, D. & Mieli-Vergani, G. Autoimmunity after liver transplantation. *Hepatology* **36**, 271-6 (2002).
152. Lunel, F. & Cacoub, P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **31 Suppl 1**, 210-6 (1999).
153. Mazzeo, C. et al. Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* **52**, 1030-1034 (2003).
154. Koziel, M. J. Immunology of viral hepatitis. *Am J Med* **100**, 98-109 (1996).
155. Miller, G. & Lipman, M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 190-4 (1973).
156. Koziel, M. J. et al. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* **96**, 2311-21 (1995).
157. Akkina, R. K. & Raisch, K. P. Intracellular virus-induced polypeptides of pestivirus border disease virus. *Virus Res* **16**, 95-105 (1990).
158. Ausubel, F. M. in *Current Protocols in Molecular Biology* 10.18.1 (John Wiley and Sons, New York, 1989).
159. Rispeter, K. et al. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. *Virus Genes* **21**, 179-88 (2000).
160. Parker, K. C., Bednarek, M. A. & Coligan, J. E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* **152**, 163-75 (1994).
161. Rammensee, H. G., Friede, T. & Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178-228 (1995).

